

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number:

2002-356437

(43)Date of publication of application: 13.12.2002

(51)Int.Ci.

A61K 38/00 A01K 67/027 A61K 31/711 A61K 45/00 A61K 48/00 A61P 19/00 A61P 19/02 A61P 19/08 A61P 19/10 A61P 43/00 C12N 5/06 C12N 15/09 G12Q 1/02 C12Q 1/68 GOIN 33/15 GOIN 33/50 GOIN 33/53 GOIN 33/566 // CO7K 14/47

(21)Application number: 2001-235851 (71)Applicant: TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing: 03,08,2001 (72)Inventor: HIKICHI YUICHI

(30)Priority

Priority number: 2000242767 Priority date: 04.08.2000 Priority country: JP

# (54) USE OF GLI1 GENE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a use of Gli1 gene.

SOLUTION: A screening method using a cell capable of expressing Gli1 gene can be used for the search of a compound or its salt having an activity to control the expression of Gli1 gene. A compound having an activity to promote the expression of Gli1 gene has a bone or cartilage inducing activity and, accordingly, it can be used as an agent for preventing and treating diseases of orthopedic field, diseases of dental surgery field and osteoporosis, etc. It is further usable as a treating agent for bone grafting in cosmetic surgery field and a differentiation inducing agent for autotransplantation in regeneration medicine. A compound active to inhibit the expression of Gli1 gene can be used e.g. as a preventing and treating agent for hyperosteogenesis or hyperchondrogenesis.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration] Searching PAJ 2/2 ページ

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許/F (J P)

# 四公公開特許公報(A)

(II)特許出版公開番号 特別2002-356437 (P2002-356437A)

(43)公開日 平成14年12月13日(2802.12.13)

(51) Int.CL*		業別配号	PI		ý	(参考)**(-1271
ASIK	38/00		AOIK	67/027		3G045
AOIK	87/027		A61K	31/711		48024
ASIK	31/711			45/00		48083
	45/00			48/00		48088
	48/00		ASIP	19/00		4C884
			等变辨求 未辨求 緒	表項の数51	OL (全 88 頁)	最終質に続く

(21) (出願養号 特徽2001-235851(P2001-235851)

(22) 出版日 平成13年8月3日(2001.8.3)

(31)優先権主張番号 特額2000-242767(P2000-242767)

(32)優先日 平成12年8月4日(2000.8.4)

(33)優先權主張国 日本(JP)

(71) 出版人 000002334

武田業品工業株式会社

大阪府太阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 引維 裕一

紫城奥つくば市松代4丁目21番? シャレ

ールつくば松代1号様504号

(74)代理人 100093676

弁理士 小林 箱子 (外3名)

最終質に続く

## (E4) [発明の名称] G111遺伝子の用途

# (57) 【要約】

【課題】 G!!1遺伝子の用途の提供。

【効果】 本範期のG 1 i 1 遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いたスクリーニング方法は、G 1 i 1 遺伝子の発展を制御する所性を有する化合物またはその塩の探索に用いることができる。G 1 i 1 遺伝子の差異を促進する所性を有する化合物は骨、あるいは軟骨誘導活性を有するため、整形外科領域の疾患、または歯科領域の疾患、さらには骨粗壁症などの予防・治療剤として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤としても用いることができるし、再生医療における自家移植の蝶の分化誘導剤としても利用できる。一方、G 1 i 1 遺伝子の発現を限常する活性を有する化合物は、例えば骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 G111タンパク質、その部分ペプチド またはその塩を含有する骨・軟骨分化誘導剤。

3

【請求項2】 G1:1タンパク質が配列番号:10。 配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15また は配列番号:17で表されるアミノ酸配列と同一もしく は実質的に簡一のアミノ酸配列を含有するタンパク質で ある請求項1記載の利。

【請求項3】 G111クンパク質が配列番号:10、 **配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15また 10** は紀列番号:17で表されるアミノ酸配列を含有するク シバク質である請求項1記載の剤。

【請求項4】 G:i1タンパク質、その部分ペプチド またはその複を含有する骨折、変形性関節症、骨関節 ※、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症また は骨相鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療 剤、骨再建剤または骨移植治療剤。

【請求項5】 G1 i 1 ダンパク質またはその部分ペプ チャをコードするDNAを含有する質・軟骨分化誘導

【請求項6】 DNAが配列番号:9、配列番号:1 2、配列番号:14、配列番号:16または配列番号: 18で表される塩基配列を含有する請求項5配数の剤。 【糖素項7】 GIiュタンパク質またはその部分ペプ チドをコードするDNAを含有する銀換えペクターを含 有する請求項5記載の別。

【糖求項8】 GLi1タンパク質またはその部分ペプ チドをコードするDNAを含有する骨折。変形性関節 症、骨間節炎、軟骨损傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無 の再生治療剤、骨再発剤または骨移植治療剤。

【請求項9】 Glilタンパク質。その部分ペプチド またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴 とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項10】 G1 11 クンパク質。その部分ペプチ ドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特 微とする骨折、変形性関節症。骨関節炎、軟骨損傷、外 傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨椎総能の予防 ・治療方法。

【請求項11】 骨・軟骨分化誘導剤を製造するための 40 G111タンパク質、その部分ペプチドまたほそれらの 塩の使用。

【清水项12】 骨折、变形性腹肺症、骨膜肠炎、軟骨 損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆 症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再 建剤または骨移植治療剤を製造するためのGIi1タン パク質、その部分ペプチドまたはそれらの塊の疾用。

【請求項13】 Gillタンパク餐またはその部分べ プチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与す ることを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項14】 Glilタンパク質またはその部分べ プチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与す ることを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟 骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗 疑症の予防・治療方法。

【請求項15】 骨・軟骨分化誘導剤を製造するための Glilタンパク質またはその部分ペプチドをコードす るDNAの使用。

【請求項16】 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨 損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆 症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再 強剤または骨移植治療剤を製造するためのGlillタン パク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの使

【請求項17】 配列器号:10、配列器号:11、配 列番号:18、配列番号:15または配列番号:17で 表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア ミノ機能列を含有するタンパク質またはその部分ペプチ ドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質 26 的に相様的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを 含有する骨・軟骨分化阻害剤。

【請求項18】 配列器号:10、配列器号:11. 配 列番号:13、配列番号:15または配列番号:17で 一巻されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア ミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチ ドをコードするDNAの塩茶配列に相補的もしくは実質 的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを 含有する骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤。

【清末項19】 配列器号:10、配列器号:11、配 形成症または骨粗縁症の予防、治療剤、骨・軟骨矢損部 30 列番号:13、配列番号:15または配列番号:17で 表されるアミノ酸配列と関一もしくは実質的に関一のア ミノ酸配列を含有するタンパク賞またはその部分ペプチ ドをコードするDNA、または該DNAの塩基配列に相 補的もしくは実質的に相補的な複基配列を含有するアン チセンスDNAを含有する骨・軟骨疾患の診断剤。

> 【請求項20】 配列番号:10、配列番号:11、配 列番号:13、配列番号:15または配列番号:17で 表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア ミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチ ドをコードするDNA、または該DNAの塩基配列に相 補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアン チセンスDNAを用いることを特徴とする骨・軟骨疾患 の診断方法。

> 【請求項21】 G111タンパク質、その部分ペプチ 下またはそれらの塩の抗体を含有する骨・軟骨疾患の診

> 【請求項22】 G1 [1タンパク質、その部分ペプチ ドまたはそれらの塩の抗体を用いることを特徴とする骨 軟骨疾患の診断方法。

【請求項23】 G 1 ± 1 タンパク質、その部分ペプチ

(3)

4

ドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする骨・軟骨 分化鋼節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニ ング方法。

【請求項24】 G1 F1 タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とする諸求項23配義のスクリーニング方法。

【請求項2.5】 Glilタンパク質またほその部分ペ ブチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在 下および非存在下に培養し、軟骨分化のマーカー遺伝子 の発現量を測定することを特徴とする請求項2.8記載の 10 スクリーニング方法。

【請求項26】 軟骨分化のマーカー遺伝子が11型B コラーゲン遺伝子である請求項25記載のスクリーニン グ方法。

【請求項27】 Glilタンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、細胞の軟骨分化状態を観察することを特徴とする請求項23記載のスクリーニング方法。

【請求項28】 Glilタンパク質、その部分ペプチー20 ドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする質・軟 骨分化調節作用を育する化合物またはその塩のスクリー ニング用キット。

【緯泉頃29】 籍建項23~27記載のスクリーニング方法、または請求項28記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる。骨・軟骨分化調節作用を有する 化合物またはその塩。

【請求項30】 請求項29記載の化合物またはその塩 を含有する骨・軟骨分化調節額。

【請求項31】 請素項29記載の化合物またはその第 30 を含有する骨折、変形性關節症、骨関節炎、軟骨損傷、 外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨 ・軟骨形成過測症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再 生治療剤、骨再強剤または骨移植治療剤。

【請求項32】 請求項29記載の化合物またはその塩 の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする質・軟 骨灰患の予防・治療方法。

【請求項33】 請求項29記載の化合物またはその塩 の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、 変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全 40 症、軟骨無形成症、骨粗鬆底または骨・軟骨形成過剰症 の予助・治療方法。

【請求項34】 骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造する ための請求項29記載の化合物またはその塩の使用。

【請求項35】 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨 類傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症ま たは骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損 部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造す るための請求項29記載の化合物またはその塩の使用。

【諸求項36】 GIi1タンパク質、その部分ペプチ 50 たはその権を含有する医薬。

ドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特 像とする青・軟骨分化誘導方法。

【請求項37】 Glilタンパク質、その部分ペプチ ドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特 激とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外 傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防 ・治療方法。

【請求項38】 Glil版伝子を発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とするGlil版伝子の発現を翻御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【諸老項39】 Giil遊伝子を発展する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に溶養し、Giil遊伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを用いてそれぞれのGlilタンパク質をコードするmRNAの機を測定することを特徴とする語求項38記載のスクリーニング方法。

【請求項40】 Glil激伝子のプロモークーもしく はエンハンサーをレポーター選伝子に連結させたDNA で形質転換した網胞を試験化合物の存在下および非存在 下に培養し、それぞれの該レポーター適伝子の発現を検 出することを特徴とするGlil適伝子のプロモーター もしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化 合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項41】 Glil選伝子を発現する能力を有する細胞が骨または軟骨への分化能を有する細胞あるいは 既に分化形態を示している細胞である請求項38記載の スタリーニング方法。

【請求項42】 G i i 1遺伝子を発現する能力を有する細胞を含有することを特徴とするG i i 1遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項43】 Glil遺伝子のプロモーターもしく はエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNA で形質転換した細胞を含有することを特態とするGli 1遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を 調御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項44】 請求項38記載のスクリーニング方法、または請求項42記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる。G1:1遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩(但し、G1+3遺伝子またはその産物を除く)。

【請求項45】 請求項40記載のスクリーニング方法、または請求項43記載のスクリーニング用キットを用いて得られるる、G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩。

【請求項46】 請求項44または45記載の化合物またけその複多合有する原源

1.5

10

【請求項47】 請求項44または45記載の化合物またはその塩を含有する骨・軟骨疾患の予防・治療剤。

5

【請求項48】 請求項44または45記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法。

【請求項49】 骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するための請求項44または45配載の化合物またはその 塩の使用。

【請求項50】 G1 i 1遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨・軟骨分化誘導力法。

【請求項51】 Glil遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節表, 軟骨損傷, 外傷、骨形成不全症, 軟骨無形成症または骨細鬆症の予防・治療方法。

#### 【発明の詳細な説明】

## [0001]

【発例の属する技術分野】本発明はGli1遺伝子を発 現する能力を有する細胞を用いたGli1遺伝子の発現 を制御(促進または風害)する特性を有する化合物また はその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング方法 20 を用いて得られうる化合物またはその塩、および該化合 物の用途に関する。

#### [0002]

【保楽の技術】グリア芽腫遺伝子(GIT1、GIT2 およびG113)のうち、G111遺伝子の産物である GIIIタンパク質はzine fingerを有する転写因子に 綴し、ショウジョウバエの転等関手のi (Cubitus inte rruptue)の脊椎動物におけるボモログとされている (A za-Blanc, P. et al., Trends Genet. (1999) 15, 458-482)。ショウジョウバエClの機能については研究が、 進んでおり、CIが誘導する分子などが報告されている (McMahon, A.P. et al., Cell (2009) 109; 185-18 8) 。 G 1 f タンパク質については、3 種のG 1 f タン バク質すべてがzinc Finger領域を介して共通な配列に 結合すること。G ( ) 3クンパク質が直接G ( ) 1遺伝 子に含まれるプロモーター領域に結合し、その転写を誘 薄していることなどが報告されてはいるが、GLiIク ンパク質の機能はショウジョウバエのCiタンパク質の 機能からの類雑が主となっており、誘導分子などについ ても未知の点が多い。一方。G1「1遺伝子発現はヘッ 40 ジホック(hedgehog)と呼ばれる可溶性分泌タンバク質 によるシグナル伝達によって誘導されるとされている (Bai, P. et al., J. Biol. Chem. (1999) 274, 8143-8 152)。ヘッジホッグファミリーは昆虫から脊椎動物ま でを含む多くの動物額における形態形成の鍵として注目 されている一群のタンパク周子であり、例えばSonic be dgelingの活性部位であるN末端ドメインを強制発現させ た繊維芽細胞をスードマウスに移植すると異所性骨形成 が誘導されることが報告されている (Kinto, N. et a) 1., PEBS lett. (1997) 404.319-323) 。これらの点で

ヘッジホッグタンパク質は様々な骨・軟骨輝著、骨・軟 骨疾患の治療、予防に有効と考えられるが、天然には微 量にしか存在せず、治療に使用するべく大量に入手する ためには組み換え型タンパク質を生産する必要がある。 一般的に組み換え型タンパク質の生産は低分子化合物の 生産よりはるかに多くの費用を要し、またタンパク質と いう特性から、医薬品としての物性、投与法にも制約が ある。

#### [0003]

【発明が解決しようとする課題】骨・軟骨組織は未分化 間葉系細胞等の多分化能を有する細胞の骨・軟骨舶駆細 胞への分化決定の後、骨・軟骨細胞への分化、増殖、骨 ・軟骨基質の合成といった一連の過程を経て形成され る。動生期や骨折治癒などの骨形成過程においては一般 に軟骨分化が骨形成に先立って起こることから、軟骨分 化促進は骨分化促進にもつながる。障害を受けた骨・軟 骨組織の修復や誘導を要する疾患、あるいは過形成が問 題となっている疾患はこれらのいずれかの過程が破綻し ていると考えられるが、これらを治療に向わせる安価 で、効果的な優れた医薬品の細製が切望されていた。

### [0004]

【議題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために緩惫検討した結果、Glilの機能解析研究においてGlilを強制発現させると、軟骨マーカーの発展が亢進することを見出し、さらには例えばScleraxisなどのヘッジホッグングナルに関与するとの報告がない転写因子の遺伝子を強制発現させることによってもGlil誘導は可能であることなどからヘッジホッグタンパク質を用いなくともGlil発現の30 制御が可能であることを見出した。さらにヘッジホッグシンパク質を用いなくともGlil発現のシーセプターに直接作用するものではない一部の既存低分子化合物がGlilの発現を誘導し、ひいては軟骨マーカー遺伝子の発現をも誘導することを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに物討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

# [0005] すなわち、本発明は

(1) G 1 (1 タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨・軟骨分化誘導剤、(2) G 1 i 1 タンパク質が配列番号:10、配列番号:11、配列番40 号:13、配列番号:15または配列番号:17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である前記(1) 影戦の剤、(3) G 1 i 1 タンパク質が配列番号:10、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15または配列番号:17で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質である前記(1) 記載の剤、(4) G 1 i 1 タンパク質である前記(1) 記載の剤、(4) G 1 i 1 タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨折、変形性関節症、骨関節疾、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗微症の予防・治療剤、骨・

(5).

剤、(5)Glilタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する管・軟骨分化誘導剤、

(6) DNAが紀列番号: 9、配列番号: 12、配列番 号:14、配列番号:16または配列番号:18で表さ れる塩基配列を含有する商配 (5) 記載の剤。 (7) G 1 主1 クンパク質またほその部分ペプチドをコードする DNAを含有する組換えベクターを含有する前記(5) 記載の額、(8)GIIIタンパク質またはその部分学 プチドをコードするONAを含有する骨折、変形性関節 症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無 形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部 の再生治療剤、骨再建剤または骨移輸治療剤。(9) G 1 1 1 タンパク質。その部分ペプチドまたはその塩の有 効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨分 化誘導方法、(10) G I I I タンパク質。その部分べ プチドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与すること を特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損 傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症 の予紡・治療方法、(11) 骨・軟骨分化器導剤を製造 するためのG 1 1 1 タンパク質、その部分ペプチドまた。 はそれらの塩の使用、(12)骨折、変形性関節症、骨 閱節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症 または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生 治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するための GTi」タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの 塩の使用、(13) Glilタンパク質またはその部分 ペプチドをコードするDNAの有効量を暗乳動物に投与 することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法、(14) GIi1タンパク数またはその部分ペプチドをコードす るDNAの有効量を哺乳動物に投与することを特徴とす。 る骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨 形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療 方法。(15) 骨・軟骨分化誘導剤を製造するためのG 111タンパク翼またはその部分ペプチドをコードする DNAの使用、(1 6) 骨折、変形性関節症、骨関節 奏、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症また。 は骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療 剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するためのG 1 11タンパク質またはその部分ペプチドをコードするD NAの使用、(17) 配列番号:10. 配列番号:1 部列委員:13.配列委号:15まだは配列委号: 17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同 一のアミノ微配剤を含有するタンパク質またはその部分 ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしく は実質的に相補的な窒基配列を含有するアンチセンスD NAを含有する骨・軟骨分化阻害剤、(18)配利量 号:10、配列等号:11、配列番号:13、配列番 号:18または配列番号:17で変されるアミノ酸配列 と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する クンパク質まだはその部分ペプチドをコードするDN

A、または該DNAの塩基配列に相補的もしくは実質的 に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含 有する曾、軟骨形成過期症の予防、治療剤、(1'0) | 配 列番号:10、配列番号:11、配列番号:13、配列 番号:15またけ配列番号;17で表されるアミノ酸配 列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸症列を含有す るタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDN Aの塩基配列に相縮的もしくは実質的に相縮的な塩基配 列を含有するアンチセンスDNAを含有する管・軟骨疾 患の診断剤、(20)配列番号:10、配列番号:1 1、配列番号:13、配列番号:15または配列番号: 17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同 一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分 パプチドをコードするDNA、または該DNAの複基配 列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有す るアンチセンスDNAを用いることを特徴とする骨・軟 替疾患の診断方法、(21) Glilタンパク質。その 部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を含有する質・軟 骨疾患の診断剤、(22)Glilタンパク質、その部 分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を用いることを特徴 とする骨・軟骨疾患の診断方法。(23) G 1 i 1 タン パク賞、その部分ペプチドまたほそれらの塩を用いるこ とを特徴とする骨・軟骨分化調節作用を有する化合物ま たはその塩のスクリーニング方法。(24)G111夕 ンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有す る御胎を用いることを特徴とする前記(23)記載のス クリーニング方法、(2 5)G l i 1タンパク質または その部分ペプチドを発展する能力を育する細胞を試験化 合物の存在下および非存在下に培養し、軟骨分化のマー カー遺伝子の発現量を測定することを特徴とする前記 (23) 貂驤のスクリーニング方独、(28) 教育分化 のマーカー遺伝子が11類8コラーゲン遺伝子である前 部(25)配載のスクリーニング方法、(27) G 1 1 1 タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を 有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養 し、細胞の軟骨分化状態を観察することを特徴とする前 記(23)記載のスクリーニング方法。(28)GII 1 タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含 有することを特徴とする管・軟骨分化調節作用を有する 40 化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(2) 9) 補紀(23)~(27) 記載のスクリーニング方 法、または前記(28)記載のスクリーニング用キット を用いて得られうる。骨・軟骨分化調節作用を有する化 合物またはその塩、(30)前距(29)記載の化合物 またはその権を含有する骨・軟骨分化調節剤、(31) 前記(29)記載の化合物またはその塩を含有する骨 折、変形性關節症、骨関節炎、軟骨損傷、昇傷、骨形成 不全症、軟骨無形成症、骨粗粉症または骨・軟骨形成過 翔症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨

50 再建剂または骨移植治療剤、(32)前記(29)記載

の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与するこ とを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法、(33) 前記(29)記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳 動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、 骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症。軟骨無形成 征、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療方 法、(34)骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するため の前記(29)記載の化合物またけその塩の使用。(3 5) 骨折、菱形性颞節症、骨髓節炎、軟骨損傷、外傷、 骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨、軟骨 形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療 剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するための前距 (29) 配載の化合物またはその塩の使用。(36) G 1 1 1 タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の作 用を増強または話性化することを特徴とする骨・軟骨分 化誘導方法、(37) Glilタンパク質、その部分ペ プチドまたはその塩の作用を増強または活性化すること を特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損 傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症 の予防・治療方法、(38) Glil遺伝子を発現する 20 能力を有する細胞を用いることを特徴とするGIi1歳 伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩 のスクリーニング方法。(39) Gli1 1 選伝子を発現 する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存 在下に培養し、GIII遺伝子DNAもしくはその相補 DNAまたはその部分DNAを用いてそれぞれのG Li 1タンパク賞をコードするmRNAの量を測定すること を特徴とする前記(38)記載のスクリーニング方法、 (40) G11 (遺伝子のプロモーターおしくはエンハ 換した細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養 し、それぞれの欲レポーター遺伝子の発現を検出するこ とを特徴とするGii1歳伝子のプロモーターもしくは エンハンサーの活性を制御する作用を有する化台物また はその塩のスクリーニング方法、(41)G1i1還伝 子を発現する能力を有する細胞が骨または軟骨への分化 能を有する細胞あるいは既に分化形態を示している細約 である前記 (3.8) 記載のスクリーニング方法、(4 2) Gii1瀬伝子を発現する能力を有する細胞を含有 することを特徴とするGlil遺伝子の発現を制御する。 活性を有する化合物またほその塩のスクリーコング用や ット、(43) G上11歳伝子のプロモーターもしくは エンハンサーをレポーター遺伝子に連続させたDNAで 形質転換した網胞を含有することを特徴とするG l i l l 遺伝子のプロモーターもしくはエンバンサーの活性を翻 御する作用を有する化合物またほその塩のスクリーニン グ用キット。(44)前記(38)記載のスクリーニン グ方法。または前記(42)記載のスクリーニング用キ ットを用いて得られるる。GLi1遺伝子の発現を制御 する初性を有する化合物またはその塩(阻し、配列器

号:20または配列番号:22で表されるGII3遺伝 子まだはその産物(配列番号:19または配列番号:2 1)を除く)、(45)前記(40)記載のスクリーニ ング方法、または前記(43)記載のスクリーニング用 キットを用いて得られうる、GIII遺伝子のプロモー ターもしくはエンパンサーの活性を網御する作用を有す る化合物またはその塩、(46) 前記(44) または (45) 記載の化合物またはその塩を含有する胚薬。 (47) 前記(44) または(45) 記載の化合物また はその塩を含有する骨・軟骨疾患の予防・治療剤、(4 8) 龍記 (44) または (45) 記載の化台物またはそ の塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨 ・軟骨疾患の予防・治療方法。(49)骨・軟骨疾患の 予防・治療剤を製造するための前記(44)または(4 5) 記載の化合物主たはその塩の使用、(50) Gli 1 遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とす る骨・軟骨分化誘導方法、(5 1) G l i l 遺伝子の発 現を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形 性關節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、 軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法などを提 供する。

#### [0006]

【発明の実施の形態】 本発明においてG i j 1 遺伝子と f#Sasaki et al. Nevelopment (1899) 129,3915-3924, Kinzler, KW. et al., Science (1987) 206, 70-73 2 8 に記載されている公知の遺伝子であり、マウスの遺伝子 はAPO26305、ABO25922、ヒトの遊伝子 はX07384としてGenBankに各々対応するア ミノ酸配列とどもに登録されている。また、G1i1億 ンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転 30 伝子の多型についての研究がなされ、配列番号:14、 16および18(対応するアミノ酸配列はそれぞれ配列 番号:13、15および17)で楽される、ヒトGLi 1遺伝子上に3箇所の事基置機が存在していることが報 告されている (I. Invest. Dermatol. (2000) 115, 328 -329)。本発例において「G 1 ( 1 タンパク質) として は、配列番号:10、11、13、15または17で表 されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミ ノ酸配列を含有するタンパク質を挙げることができる。 Glilカンパク質は、例えば、温血動物(例えば、ヒ ト、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、 ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等)のあらゆる細胞(例え ば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓分細胞、骨髄 細胞、メサシギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細 腹、上皮细胞、内皮细胞、繊維芽细胞、繊維細胞、筋細 胞、筋芽細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファー ジ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細 胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨接球、滑模 細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細 胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆 50 細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球系の細胞、

3.3

またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織。例えば、 脳、脳の各部位(例、嗅球、脳頭核、大脳基底球、海 爲。視珠、視珠下部、視珠下核、大腦皮質、延髓、小 10、後頭葉、前頭葉、健膜薬、被破、尾状核、膨染、集 質)、脊髓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、 甲状腺、鯉のう、骨髄、翻腎、皮膚、筋肉、肺、消化管 (例、天鹅、小鹅)、血管、心臓、胸腺、脾臟、質下 腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎 盤、子宮、骨、腸筋、骨絡筋などに由来するタンパク質 であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。 なかでも覆血動物(例えば、ヒト、モルモット、ラッ ト」マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、 サル等)の細胞(例えば、グリア細胞、骨髄細胞、嚢度 御胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨細胞もしく は骨芽細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もし くはガン舞胞等)などに由来するタンパク質が好ましく 用いられる。

【0007】配列番号:10、11、13、15または 1.7で表わされるアミノ鍛配列と実質的に同一のアミノ 砂板列としては、例えば、配列番号:10、11、1 3. 15またはモアで変わされるアミノ酸配列と約50 %以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約7 0%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好 ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の 相関性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。本拠例 の配列番号:10、11、13、15または17で表わ されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含 有するタンパク質としては、例えば、配列番号:10、 11、13、15または17で扱わされるアミノ酸配列 0、11,13、15または17で表わされるアミノ酸 配列を有するタンパク質と実質的に飼質の活性を有する カンパク質などが好ましい。実質的に閲覧の活性として は、例えば、転写話性や骨・軟骨分化誘導作用などが挙 げられる。実質的に同質とは、転写活性や骨・軟骨分化 誘導作用が性質的に同賞であることを示す。したがっ て、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用が同等(例、約 0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、よ り好ましくは約り、5~2倍)であることが好ましい。 が、これらの話性の程度やケンパク質の分子量などの量 40 | 的要素は異なっていてもよい。骨・軟骨分化誘導作用な どの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができ るが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従っ て講定することができる。脳等話性の測定は公知の方 法、例えばレポーターアッセイや、RTーPCRなどの 方法を用いて行うことができる。

【0008】また、本発射で用いられるのGlilタン バク質としては、**②**配列番号 ::10、11、13、15 または17で表わされるアミノ酸配列中の1または2個 以上 (好ましては、1~30個程度、より好ましくは1 50

~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))の アミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号:10、 11.13、15または17で表わされるアミノ酸配列 に1または2個以上(毎ましくは、1~30個程度。よ り好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個 (1~5個) )のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、② 配列番号:10、11、13、15または17で表わさ れるアミノ酢配列中の1または2個以上(好ましくは、 1~30個程度。より好ましくは1~10個程度、さら 10 に好ましくは数据(1~5個))のアミノ酸が他のアミ ノ酸で微模されたアミノ酸配列。または優それらを組み 合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用い られる。

【0.009】本明細書におけるGlilタンパク質は、 ペプチド表記の僧例に従って、左端がN末端(アミノ末 | 難) 、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列 番号:10、11、13、15または17で変わされる アミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本 発明のGlilタンバク類は、C未端がカルボキシル系 (一〇〇〇日)、カルボキシレート(一〇〇〇)、アミ ド (一CONHa) またはエステル (一COOR) の何 れであってもよい。ここでエステルにおけるRとして は、例えば、メチル、エチル。カープロビル、インプロ ビルもしくはnープチルなどのCia アルキル器。例え ば、シクロベンチル、シクロヘキシルなどのじゅ シク ロアルキル基、例えば、フェニル、ローナフチルなどの Con アリール基、例えば、ペンジル、フェネチルなど のフェニルーCio アルキル基もしくはαーナフチルメ チルなどのaーナフチルーOic アルキル基などのC と実質的に関一のアミノ酸配列を含有し、配列番号:1. 30 👊 アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用さ れるビバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発 明におけるGlilカンパク質がご未帰以外にカルボキ シル基(またはカルボキシレート)を有している場合、 カルボキシル基がアミド化またはエステル化されている ものも本発明におけるGLL1タンパク質に含まれる。 この場合のエステルとしては、例えば上記したC未燥の エステルなどが用いられる。さらに、本発明におけるG 1 i 1 タンパク質には、上記したタンパク質において、 N末端のメチオニン模様のアミノ基が保護基(例えば、 ホルミル蒸、アセチルなどのCos アルカノイル基など のCia アシル基など)で保護されているもの、N端側 が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタ ミン酸化したもの。分子内のアミノ酸の個額上の顕換基 《例えば』-OH、-SH、アミノ器、イミグゾール 基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基 《例えば、ホルミル基、アセチルなどのCoo アルカノ イル基などのCia アシル基など)で保護されているも の、あるいは締鎖が組合したいわゆる糖タンパク質など の複合タンパク質なども含まれる。本発明におけるGl - i 1 タンパク質の具体倒としては、例えば、配列番号:

10、11、13。15または17で表わされるアミノ 酸配列を含有するタンパク質などが用いられる。

13

【0.010】本発期におけるGli1タンパク質の部分 ペプチド (以下、部分ペプチドと略記する場合がある) としては、上記したGIIIタンパク質の部分ペプチド であれば何れのものであってもよい。本発明における部 分ペプチドのアミノ酸の数は、上組したGIIIタンパ ク質の構成アミノ酸配列のうち少なくども20個以上。 好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上の アミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましい。実質 10 的に関一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約 50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは 約70%以上、さらに好ましくは約80%以上。なかで も好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以 上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。ここで、「実 質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質 的に問質の活性」の測定は上記と開議に行うことができ Ŏ,

【0011】また、本発明の部分ペプチドは、上記アミ ノ酸紀列中の1または2個以上(好ましくは、1~10 20 翻程度、さらに好ましくは微倒(1~8個))のアミノ 酸が欠失し、または、そのアミノ機配列に1または2個 以上(針ましくは、1~20個程度、より好ましくは1 ~10個程度、さらに好ましくは数据(1~5個))の アミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1ま た付2個以上(好ましくけ、1~10個程度、より好ま しくは数額、さらに好ましくは1~5個程度)のアミノ 酸が他のアミノ酸で微接されていてもよい。また、本発 朝の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基(--COO H) カルボキシレート (-COO) 、アミド (-C ONH<sub>2</sub>) またはエステル (-COOR) の何れであっ てもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、上親し た本発明のGlillタンパク質と開様に、N末端のメチ オニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、 N端側が生体内で印断され生成したGlnがピログルタ ミン酸化したもの。分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基 が適当な保護器で保護されているもの、あるいは糖菓が 結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども 含まれる。本発明のGI「1タンパク概またばその部分 ベプチドの権としては、酸または塩基との生理学的に許 40. 容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許客される 一般付加塩が好ましい。この様な塩としては、倒えば、無 機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との 塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸。ギ酸、プロピオン 酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン 酸、リンゴ酸、蓚酸。安息香酸、メタンスルホン酸、ベ ンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

【0012】本発明におけるG1+1タンパク質または ン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーデル その塩は、上記した哺乳動物の細胞または組織から公知 類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのエトリル のタンパク質の精製方法によって製造することもできる 50 類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいは

し、後に記載する本発明のG 1 i 1 タンパク質をコード するDNAを含有する形質駆換体を培養することによっ ても製造することができる。また、後に記載するタンパ ク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。 哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、哺乳動物 の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出 を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交 換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み 合わせることにより精製単離することができる。

【0013】本発明におけるGlilタンパク質もしく はその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の 合成には、通常市販のタンパク賞合成用樹脂を用いるこ とかできる。そのような樹脂としては、例えば、クロロ メチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルア ミン樹脂、アミノメチル樹脂、4ーペンジルオキシベン ジルアルコール樹脂。 4ーメチルベンズヒドリルアミン 樹脂、PAM樹脂、4ーヒドロキシメチルメチルフェニ ルアセトアミドメチル樹脂。ボリアクリルアミド樹脂、 4~ (2', 4'~ジメトキシフェニルーヒドロキシメ チル) フェノキシ樹脂、4~(2\*, 4' ージメトキシ フェニルーF面oeアミノエチル)フェノキシ樹脂など を挙げることができる。このような複話を用い、ローア ミノ塩と無鱗官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的 とするタンバク質の配列通りに、公知の各種総合方法に 従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタン バク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに 高希釈密接中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施 し、目的のタンパク質またはそのアミド体を取得する。 上記した保護アミノ敵の総合に関しては、タンパク質台 成に使用できる各種活性化試薬を用いることができる が、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類 としては、DCC、N、N′ージインプロビルカルボジ イミド、NーエチルーN'ー(3ージメチルアミノブロ サル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる 話性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOB t、H OOB t) とともに保護アミノ機を直接樹脂に添加する か、または、対称酸無水物またはHOBtエステルある いはHOOBとエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸 の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。 【0014】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用 いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しう ることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例え ば、N、Nージメチルボルムアミド、N、Nージメチル アセトアミド、パーメチルビロリドンなどの酸アミド 類。塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化 水素額。トリフルオロエタノールなどのアルコール類、 ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ビリジ ン。ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル 類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル

これらの適宜の混合物などが用いられる。反応程度はタ ンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られてい る範囲から適宜選択され、通常約一20℃~50℃の範 **圏から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は** 通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応 を用いたテストの結果、総合が不十分な場合には保護基 の脱離を行うことなく総合反応を繰り返すことにより十 分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分 た総合が得られないときには、無木踏骸またはアセチル イミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化する。 ことができる。

38

【5015】照料のアミノ基の保護薪としては、例え ば、2。Boe、ターシャリーベンテルオキシカルボニ ル、イフボルニルオギシガルボニル。4ーメトキシベン ジルオキシカルボニル、GI-2、Bェー2、アダマン チルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロ イル、ホルミル、2…ニトロフェニルスルフェニル、ジ フェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられ る。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化 【例えば、メチル、エチル、プロビル、プチル、ターシー マガープチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シタ ロヘプチル、シクロオクチル、2…アダマンチルなどの 直攤は、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)。ア ラルキルエステル化 (例えば、ベンジルエステル、4一 ニトロペンジルエステル、4ーメトキシペンジルエステ ル、4ークロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエス デル化)、フェナシルエステル化。ペンジルオキシカル ポニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニル ヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護 することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステ 30 ル化またはエーテル化によって保護することができる。 このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル 基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロ イル艦、ペンジルオキシカルボニル艦、エトキシカルボ ニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。 また、エーテル化に過する基としては、例えば、ペンジ ル糕、テトラヒドロビラニル基、セプテル基などであ る。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、 例えば、Bェミ、Cミュ-Bェミ、2ーニトロペンジ ル、Bェー2、ターシャリーブチルなどが用いられる。 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、 To's、4ーメトキシー2, 3, 6ードリメチルベンゼ ンスルホニル、DNP、ペンジルオキシメチル。Bo m、Bec、Tri、Fmogなどが用いられる。

【0016】原料のカルボキシル基の活性化されたもの としては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エ ステル (アルコール (例えば、ペンタクロロフェノー) ル。2、4、5~6リクロロフェノール、2、4~ジニ トロフェノール。シアノメチルアルコール。パラニトロ フェノール、HONB、Nーヒドロキシスクシミド、N 50 単なペプチダーゼで関新することによって製造すること

ーヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル) などが用いられる。原料のアミノ基の結性化されたもの としては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられ る。保護基の除去 (脱離) 方法としては、例えば、Pa 一黒あるいはP a 一炭素などの触媒の存在下での水果気 流中での接触還元や、また。無水フラ化水素、メタンス ルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸。トリフルオ ロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジ イソプロビルエチルアミン、トリエチルアミン、ビベリ ジン、ピペラジンなどによる塩素処理、また液体アンモ ニア中ナトリウムによる選元なども用いられる。上記酸 処理による観難反応は、一般に約一20℃~40℃の間 度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソ ール、フェノール、チオアニゾール、メタクレゾール、 パラクレゾール、ジメチルスルフィド。 1。 4ープタン ジチオール、1、2~エタンジチオールなどのようなカ チオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンの イミダゾール保護落として用いられる2」4ージニトロ フェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリ プトファンのインドール保護基として用いられるホルミ ル基は上記の1、2ーエタンジチオール、1、4ープタ ンジチオールなどの存在下の敵処理による脱保護以外 に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによる アルカリ処理によっても除去される。

【0.017】 原料の反応に関与すべきでない官能器の保 護ならびに保護薬、およびその保護基の脱職、反応に関 与する官能器の活性化などは公知の基または公無の手段 から適宜選択しうる。タシバク質のアミド体を得る別の 方法としては、例えば、まず、カルボキシ未竣アミノ酸 かローカルボキシル基をアミド化して保護した後、アミ ノ基側にペプチド (タンパク質) 葉を所望の類長まで延 ばした後、該ペプチド銀のN末端のαーアミノ基の保護 基のみを除いたタンパク質とC未帰のカルボキシル基の 保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タ ンパク質を上記したような混合溶媒中で締合させる。縮 合反応の詳細については上記と同様である。結合により 得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法により すべての保護基を除去し、所望の組タンパク質を得るこ とができる。この相タンパク質は既知の各種精製手段を 駆使して精製し、主要断分を凍結乾燥することで所望の タンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質 のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミ ノ酸のαーカルボキシル基を所能のアルコール類と縮合 しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と 間様にして、衝望のタンパク質のエスデル体を得ること ができる。

【0 0 1 8】本差別におけるG 1 i 1 タンパク質の部分 パプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に後 って、あるいは本発明におけるGlilタンパク質を選

ができる。ベブチドの合成法としては、例えば、脳相合 成法、被相合成法のいずれによっても良い。すなわち、 本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくは アミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有 する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチド を製造することができる。公知の縮合方法や保護基の膜 脚としては、例えば、以下の〇一〇に記載された方法が 挙げられる。

QM Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シン センス (Penkide Systhemis), Interscience Publisher 10 s, New York (1966年)

- OSchroeder & LULuebke, F NJFF (The Peptide), Academic Press, NewYork (19654)
- ◎泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験。 丸善(株) (1975@)
- ②矢島治明 および榊原教平、生化学実験調座 1、 タン バク質の化学IV: 205、(1977年)
- ◎矢島治明監修、総医薬品の開発 第14巻 ペプチド会成

また。反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留 20 カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー 再額晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精 製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプ チドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な 塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合 は、公知の方法によって遊離体に変換することができ

【0019】本発明におけるGli1タンバク質をコー ドするボリヌグレオチドとしては、上記した本発明にお けるGlilタンパク質をコードする塩基配列(DNA 30 またはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであ ればいかなるものであってもよい。該ボリヌクレオチド としては、本発明におけるG1i1タンパク質をコード するDNA、mRNA等のRNAであり、二本額であっ ても、一本館であってもよい。二本額の場合は、二本額 DNA、三本額RNAまたはDNA:RNAのハイブリ ッドでもよい。一本級の場合は、センス銀(すなわち、 コード銀)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非 コード郷)であってもよい。本発頻におけるG111ク シバク質をコードするボリスクレオチドを用いて、例え 40. ば、実験医学増刊 (新PCRとその応用: 15(7)、1997 記載の公知の方法またはそれに準じた方法により、G-1 11タンパク質のmRNAを定量することができる。G 111タンパク質をコードするDNAとしては、ゲノム DNA、ゲノムONAライブラリー、上記した細胞・総 総由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNA ライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラ リーに使用するバクターは、バクデリオファージ。ブラ スミド。コスミド。ファージミドなどいずれであっても よい。また、上記した締約・組織よりtotal R N Aまた - 50 - るDNAの塩茗配列の一部、または該DNAと相補的な

ltmRNA無分を翻製したものを用いて直接Reverse Tr anscripture Polymerase ChainReaction (RT, RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。 異体的には、G141タンパク質をコードするDNAと しては、例えば、配列番号:9、12、14、16また は18で表わされる塩基配列を含有するDNA、または 配列番号:9、12、14、16または18で扱わされ る塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリ ダイズする塩基配列を有し、本発用のGlilタンパク 質と実質的に刷版の活性(例、転写活性や管・軟骨分化 誘導作用など)を有するGliiタンパク質をコードす るDNAであれば何れのものでもよい。配列番号:9、 12、14、16または18で表わされる塩素配列とへ イブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番 号: 9、12、14、16または18で表わされる塩蒸 配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好 ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の 相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いら

【0020】ハイブリダイゼーションは、公知の方法あ るいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クロ -==>// (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrock et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記憶の 方法などに従って行うことができる。また、市販のライ プラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方 徳に従って行うことができる。より好ましくは、ハイス トリンジェントな条件に従って行うことができる。該ハ イストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム機 度が約19~40mM、好ましくは約19~20mM で、温度が約30~70℃、好ましくは約60~65℃ の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで得 度が約65℃の場合が最も好ましい。より具体的には、 配列番号:10で変わされるアミノ酸配列を含有するG 1 | 1 タンパク質をコードするDNAとしては、配列番 号:9で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用 いられる。配列番号:11で表わされるアミノ微配列を 含有するGIIIタンパク質をコードするDNAとして は、配列番号:12で表わされる塩基配列を含有する口 NAなどが用いられる。配列番号:13で表わされるア ミノ酸配列を含有するGlilタンパク質をコードする DNAとしては、配列番号:14で表わされる塩基配列 を含有するDNAなどが用いられる。配列器号:15で 表わされるアミノ機能列を含有するOLi1タンパク質 をロードするDNAとしては、配列番号:16で表わさ れる塩基配列を含有するONAなどが用いられる。配列 番号:17で表わされるアミノ機配列を含有するGli 1タンパク質をコードするDNAとしては、観列書号: 18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用い られる。本発明におけるGlilタンパク質をコードす

塩基配列の一部を含有してなるボリヌクレオチドとは、 下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含 するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられ る。本発明に従えば、G1i1タンパク質遺伝子の複製 または発現を観客することのできるアンチセンス・ボリ ヌクレオチド(核酸)を、クローン化した、あるいは決 定されたG111クンパク質をコードするDNAの塩基 配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたボリス クレオチド(接触)は、GISIタンパク質遺伝子のR NAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成 10 または機能を阻害することができるか。あるいはG1i 1タンパク質開源収NAとの相互作用を介してG1 11 タンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができ る。GITTタンパク質関連RNAの選択された紀列に 钼圧的なボリヌクレオチド、およびG l i l タンパク質 脚連RNAと特異的にハイブリダイズすることができる ガリスクレオチドは、生体内および生体外でG1119 ンバク質遺伝子の発現を顕第・翻御するのに有用であ り、また相気などの治療または診断に有用である。用語 「対応する」とは、遊伝子を含めたヌクレオテド、塩基 20 紀列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは 相端的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列 または紋骸とペプチド(ケンパク質)との鬩で「対応す る; とは、スクレオチド(核酸)の配列またはその相補 体から誘導される指令にあるペプチド(タンパク質)の アミノ酸を通常指している。Glilpンバク質量伝子 の5′ 羅ヘアピンループ、5′ 編6ーペースペア・リビ ート、5 第非額収額域、ボリベブチド翻訳開始コド ン。タンパク質コード領域、翻訳終止コドン、3 2 端非 翻訳総域、3、端パリンドローム総域、および3、場へ 30 アピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、 G1 i 1 タンパケ質遺伝子内の如何なる領域も対象とし て選択しうる。

【0021】目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に 相補的なボリスクレオチドとの関係、即ち対象物とハイ プリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係 は、「アンチセンス」であるということができる。アン チセンス・ポリスクレオチドは、2ーデオキシーDーリ ボースを含有しているボリデオキシヌクレオチド、Dー リンまたはピリミジン塩基のNーグリコシドであるその 他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチ ド骨格を育するその他のボリマー (例えば、市販のタン パク質技能および合成配列特異的な核酸ポリマー)また は特殊な結合を含有するその他のボリマー(但し、該ボ リマーはDNAやRNA中に見出されるような塩糕のペ アリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチ ドを含有する)などが挙げられる。それらは、二本額D NA, 一本綴DNA、二本綴RNA、一本鏡RNA、さ らにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さ 50 フェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療

らに非移権ポリヌクレオチド(または非修飾オリゴヌク レオチド〉、さらには公知の修飾の付加されたもの、例 えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付 いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のスク レオチドを類縁物で微微したもの、分子内ヌクレオチド 修飾のされたもの、例えば非荷電結合(例えば、メチル ホスホネート、ホスポトリエステル。ホスホルアミデー ト、カルバメートなど)を持つもの、電荷を有する結合 または硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエート、ホ スポロジチオエートなど)を持つもの。例えばタンパク 質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキ シン、抗体、シグナルペプチド、ポリーモーリジンな ど) や糠(例えば、モノサッカライドなど) などの側鎖 基を有しているもの、インターカレント化合物(例え ば、アクリジン、ソフレンなど)を持つもの、キレート 化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素。 酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含 有するもの、修飾された結合を持つもの「例えば」 aア ノマー型の核酸など) であってもよい。ここで「ヌクレ オシド」、「ヌグレオチド」および「綾酸」とは、ブリ ンおよびビリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾さ れたその他の複素漿型塩蓋をもつようなものを含んでい て良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよ びビリミジン。アンル化されたプリンおよびビリミジ ン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。 修飾されたスクレオチドおよび修飾されたスクレオチド はまた糖部分が修飾されていてよく。例えば、1個以上 の水獭基がハロゲンとか、脂肪族基などで置模されてい。 たり、あるいはエーテル、アミンなどの官能器に変換さ れていてよい。

【0022】本発期のアンチセンス、ボリヌクレオテド (後藤) は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸 (RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例と しては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そ してポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミ 下の分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定さ えらものではない。本苑明のアンチセンス核酸は次のよ うな方針で好ましく設計されるる。すなわち、細胞内で のアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセ りポースを含有しているポリデオキシヌクシオチド、ブ 40 ンス核酸の維趣透過性をより高める、世様とするセンス 鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし 案性があるならアンチセンス核酸の素性をより小さなも のにする。とうして修飾は当該分野で数多く知られてお 9, 612/f J. Kawakami et al. Pharm Tech Japan, Vo 1. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Cr coke et al. ed., Antiseuse Research and Applicatio ma, CRC Press, 1993などに開示がある。本発樹のアン チセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、 塩基、結合を含有していて食く、リボゾーム、ミクロス

により適用されたり、付加された形態で与えられること ができうる。こうして付加形態で用いられるものとして は、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジ ンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高め たり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例え ばこ本スポリピド、コレステロールなど)といった疎水 性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質として は、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリ ルクロロボルメート、コール酸など)が挙げられる。こ うしたものは、波酸の3 / 墨あるいは5 / 縄に付着させ 19 ることができ、塩蒸、糖、分子内スクレオシド結合を介 して付着させることができうる。その他の基としては、 核酸の3、維あるいは5、増に特異的に配置されたキャ ップ角の基で、エキソスクレアーゼ、RNssexだの スクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げら れる。こうしたキャップ用の基としては、ボリエチレン グリコール、デトラエチレングリコールなどのグリコー ルをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が 挙げられるが、それに限定されるものではない。アンチ センス核酸の阻害活性は、GIi1遺伝子またはG11 1 遺伝子を含有する組換えベクターを含有する形質転換 体、生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG li1 カンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べるこ とができる。鉄絃後は公知の各種の方法で維胞に適用で 2 S.

【0023】本発明における部分ペプチドをコードする DNAとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコー ドする塩基配列を含有するものであればいかなるもので あってもよい。また。ゲノムDNA、ゲノムDNAライ ブラリー。上記した細胞・組織由来のcDNA、上記し た細胞・細糖由来のもDNAライブラリー、合成DNA のいずれでもよい。ライブラリーに使用するペクター は、バクテリオファージ、ブラスミド、コスミド、ファ ージミドなどいずれであってもよい。また、上記した鍵 腹、細織よりmRNA両分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅する こともできる。具体的には、本発明の部分ペプチドをコ ードするDNAとしては、例えば。(1)配列番号: 9、12、14、16または18で表わされる塩基配列 40 を含有するDNAの部分塩基配列を含有するDNA、ま たは(2) 配列番号:0、12、14、16または18 で表わされる塩素配列を含有するDNAとハイストリン ジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有 し、本発明のGIiiタンパク質と実質的に開業の活性 (例、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用など)を有する Glilタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列 を含有するDNAなどが用いられる。より具体的には、 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例 えば、(1) 配列番号: 9、12、14、16または1 50 る。本発明のタンバク質の発現ベクターは、例えば、

8で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配 列を含有するDNA。または(2)配列番号:9、1 2、14、16または18で表わされる複基配列を含有 するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリ ダイズする塩基配列を含有し、本発明におけるGIiI タンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質を コードするDNAの部分塩基配列を含有するDNAなど が用いられる。配列番号:9、12、14、16または 18で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイブリ ダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号:9、 12、14、16または18で表わされる塩基配列と約 70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは 約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を 有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ま た、配列番号:9、12、14、16または18で変わ される塩基配列を含有するDNAとハイブリダイズでき るDNAとしては、例えば、配列番号:9、12、1 4、16または18で表わされる塩基配列と約70%以 上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90% 以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を育する塩 基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0024】本発明におけるG1 11 タンパク質または その部分ペプチド(以下、本発明のタンパク質と総配す る場合がある)を完全にコードするDNAのクローニン グの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列 を含有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によ って増幅するか、または適当なベクターに組み込んだり NAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコー ドするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識した ものとのハイブリダイゼーションによって鑑測すること ができる。ハイブリグイゼーションの方法は、例えば、 モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2 m d (J. Sembrock et al., Gold Spring Rarbor Lab. Pre ss, 1989) に記載の方法などに従って行うことができ る。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の 使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

【0025】DNAの塩基配列の電熱は、PCRや公知 のキット、例えば、Mutan" — superExpress Km (宝術 造)、Mutan<sup>®</sup> ーK(実務造)等を用いて。GDAーLA PCR 法、gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるい はそれらに筆じる方法に従って行うことができる。クロ ーン化された本発明のタンパク質をコードするDNAは 目的によりそのまま、または所望により制度酵素で消化 したり、リンカーを付加したりして使用することができ る。移DNAはその5°末端側に翻訳開始コドンとして のATGを有し、また3°末端側には翻訳終止コドンと してのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよ い。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当 な合成DNAアダプターを用いて付加することもでき

(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAを含む。 例えばでDNAから世的とするDNA断片を切り出し、 (ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモー ターの下流に連結することにより製造することができ ٠<u>٠</u>

【0026】ベクターとしては、大腸菌曲来のプラスミ F (例、pCR4、pCR2. 1、pBR322、pB R325、pUC12、pUC13)、結準菌由来のプ ラスミド (網、pUB110、pTP5、pC19 4)、鬱母由来プラスミド(例、pSH19、pSH1 5)、4ファージなどのバクデリオファージ。レトロウ イルズ、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの 動物ウイルスなどの値、pAI--11、pXT1、pR c/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neoな どが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとし ては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適更なプロ モーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物 網胞を宿主として用いる場合は、SRaプロモーター、 SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVブ ロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられ る。これらのうち、CMVプロモーター、SRaプロモ ーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア 異菌である場合は、ヒェップロモーター、1 в cプロモ ーター、recAプロモーター、LP:プロモーター、 1pgプロモーターなどが、宿主がパチルス裏蘭である 場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモータ 一、psnPプロモーターなど、宿主が静林である場合 は、PHOSプロモーター、PGKプロモーター、GA Pプロモーター。ADHプロモーターなどが好ましい。 審主が異虫細胞である場合は、ボリヘドリンプロモーク 一、P10プロモーターなどが好ましい。

【0027】発現ベクターには、以上の他に、所望によ りエンパンサー、スプライシングシグナル、ポリA付銀 シグナル。選択マーカー。SV40複製オリジン(以 下、SV400m (と略称する場合がある) などを含有 しているものを用いることができる。選択マーカーとし ては、例えば、ジヒドロ業酸還元酵素(以下、dhfr と略称する場合がある) 遺伝子 (メソトレキセート (M TX) 凝性1、アンビジリン耐性激伝子(以下、Amp 「と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、Neo'と解除する場合がある、G418)) 性) 等が挙げられる。特に、CHO (dh f r ) 細胞 を用いてもも「モ灌伝子を選択マーカーとして使用する 場合、目的遺伝子をチェジンを含まない塔地によっても 選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナ ル配列を、本発明のタンパク質の反端末側に付加する。 宿主がエシェリヒア属薬である場合は、PhoA・シグ ナル紀列、OmpA・シグナル紀列などが、宿主がバチ ルス្菌である場合は、αーアミラーゼ・シグナル配 列。サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母で 50 a)、13、213-217、(1977)) などが用いられる。 昆虫とし

ある場合は、MFa・シグナル配列。SUC2・シグナ ル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュ リン・シグナル配列。αーインターフェロン・シグナル 配別、挟体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用でき る。このようにして精築された本発明のタンパク質をコ ードするDNAを含有するベクターを用いて、影質転換 体を製造することができる。

24

【0028】宿主としては、例えば、エシェリヒア縣 蓋、バチルス属蓋、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞な どが用いられる。エシェリヒア展開の具体例としては、 エシェリセク・コリ (Escherichia cali) K12・DH 1 《プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデ ミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sel. USA), 60巻, 160 (1968)), JM103 (ヌクイレック・アシッズ・ リサーチ、 (Sucleic Acids Research) , 9巻, 309 (1981)) 、JA221 (ジャーナル・オブ・モレキ エラー・バイオロジー (Tournal of Molecular Biolog y), 120卷, 517(1978)), HB101(ジ ヤーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41 巻, 459(1969)〕、C600(ジェネティックス (Genetics), 39%, 440(1954)), DH5α [Inome, R., Nojima, H. and Okayama, S., Gene, 96, 23-28 (1990)), DH10B [プロシージングズ・オブ・ザ・ ナショナル・アカデミー、オブ・サイエンシイズ・オブ ・ザ・コーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A), 87卷, 4645-4649(1996)] などが 用いられる。パチルス展繭としては、例えば、パチルス ・サブチルス (Bacillus subtilis) MIIII4 (ジー ン。24巻、255(1983))、207-21 (ジャ ーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Bioch emistry)、95巻、87(1984))などが用いられ る。酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビ ∀= (Saccharomyces cerevisiae) AH 2 2, AH 2 2 R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-1 2、シノサッカロマイセス・ボンベ (Schizosaccharomy ces pombe) NCYC1913, NCYC2036, E キア・パストリス (Pichia pastoris) などが用いられ \$.

【0029】毘虫細胞としては、例えば、ウイルスがA c NPVの場合は、夜際鉄の幼虫由来株化郷族(Spodop tera frugiperda cell; S f \$500), Trichoplusia ni の中腸由来のMG 1 細胞、Trickoplusia niの卵由来のH igh Five "翻版、Mamestrabrassicae和某の翻版主意計 Estigmena acream来の細胞などが用いられる。ウイル スがBmNPVの場合は、歪曲来株化御館(Bombyx acor in:BmN細胞)などが用いられる。数S「細胞とし ては、例えば、Sf9緑胞(ARCC CEL1711)、Sf21 細胞(以上、Vaughn、J.L.ら、イン・ヴィボ(In Viv

ては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる (前田 ら、ネイテャー (Nature), 315巻, 592(198 5))。動物細胞としては、例えば、サル細胞とOS-Vero, デャイニーズバムスター細胞CHO (以)

下。CHO線能と略能)、dbfr激伝子欠損チャイニ ーズハムスター総胞CHO(以下、CHO(&bf r ) 細胞と略記)、マウスL細胞、マウスA:Tー2 O、マウスミエローマ締約、ラットGH3、ヒトドし締 脆などが用いられる。 [0030] エシェリヒア展額を形質転換するには、例 10

えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカ デミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエ - (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 21 10(1972)やジーン (Seine)、17巻, 107(1 982)などに記載の方法に従って行うことができる。 パチルス異菌を形質転換するには、例えば、モレキュラ ー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecula r & General Genetics), 1682, 111(197 9)などに記載の方法に従って行うことができる。解母 を形質転換するには、例えば、メッソズ・イン・エンザ イモロジー (Methods in Enzymology) 、194巻、1 82-187 (1991)、プロシージングズ・オブ・ ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・ オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Narl. Acad. Sci. US A)、75巻、1929(1978)などに記載の方法に 従って行うことができる。昆虫無胞または昆虫を形質転 換するには、例えば、ハイオ/テクノロジー(Bin/Tech nology), 6, 47-55(1988)) などに記載の方法に従って 行うことができる。動物細胞を形質拡換するには、例え ば、緑鹿工学別冊8新細胞工学実験プロトコール、26 3-287 (1995) (秀濶社発行) 、ヴィロロジー (Virology) 、52巻、456 (1973) に記載の力 法に従って行うことができる。このようにして、GLi 1タンパク質をコードするDNAを含有する発現ペクタ 一で形質転換された形質鉱操体が得られる。宿主がエジ エリヒア風蘭、パチルス展開である形質転換体を培養す る際、培養に使用される培地としては液体培地が適当で あり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源。 窓塞線、無機物その他が含有せしめられる。炭素源とし ては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性器 粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウ ム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカー、ペプト ン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液な どの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩 化カルシウム、リン酸皿水素ナトリウム、塩化マグネシ ウムなどが挙げられる。また、酵母エキス。ピクミン 類、生長促進因子などを添加してもよい。 培地の p Hは 約5~8が選ましい。

【0.031】エシェリヒア展葡を培養する際の暗地とし

特開2002-356437

26

『ミラー(Miller)」ジャーナル・オブ・エクスペリメ ンツ・イン・モレキュラー・ジェネディックス(Journal l of Experiments in Molecular Genetics) . 431-4 3 3, Cold Spring Barbor Laboratory, New York 1 972) が好ましか、ここに必要によりプロモーターを 効率よく動かせるために、例えば、38-インドリルア クリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエ シェリヒア異菌の場合。培養は通常約15~43℃で約 3~24時間行い、必要により、通気や微粋を加えるこ ともできる。複主がバチルス異菌の場合、培養は通常約 30~40℃で約6~24時間行わ、必要により通気や 撹拌を加えることもできる。宿主が静命である形質転換 体を培養する際、培地としては、例えば、バークホール ダー (Burkholder) 最小塔雄 (Bostian, K. L. ら、ブ ロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・ オブ・サイエレシイズ・オブ・ザ・コーエスエー (Pro c, Natl. Acad. Sci. USA) , 77%, 4505(198 0)〕 や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitte x, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナ ル・アカデミー・オブ・サイエンシイス、オブ・ザ・ユ ーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330 (1984) 〕が挙げられる。培建のp.Hは約 5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~ 35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や撤 拌を加える。

【0032】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換 体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Midiu m (Grace, T.C.C., \$4 f y ... (Nature) , 195, 782 (196 2)) に非動化した10%ウシ血清等の凝加物を適宜加え 30 たものなどが用いられる。境地のpHは約6.2~6. 4に創盤するのが好ましい。培養は運常約27℃で約3 ~5日間行い、必要に応じて通気や撹拌を加える。宿主 が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地として は、例えば、約5~20%の胎児牛血病を含むMEM塔 地 (サイエンス (Science) , 122巻, 501(195 2)) , DMEM培地(ウィロロジー (Virology) , 8 巻、396(1959)]。RPMI 1640熔線 (ジ ヤーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシ x-->3> (The Journal of the American Medical As sociation) 199墨, 519(1967)), 199時 地(プロジージング・オブ・ザ・スサイエティ・フォー ・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Sedicine) , 73卷, 1 (1950)] などが用いられる。pmは約6~8である のが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~ 6 0時間行い、必要に応じて通気や撹拌を加える。以上 のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞 ・外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0033】上記培養物から本発明のタンパク質を分離 ては、例えば、グルロース、カザミノ酸を含むM9絡地 50 精製するには、例えば。下紀の方法により行うことがで

きる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から 抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるい は無胞を集め、これを適当な緩衝液に無衡し、超音波。 リゾチームおよび/または連結融解などによって菌体あ るいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ道によりタン パク質の無抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩 衝波の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性 剤や、トリトンX-100°などの界面活性剤が含まれ ていてもよい。路巻被中にタンパク質が分泌される場合 には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上 10 **満とを分離し、上浦を集める。このようにして得られた** 培養上清。あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精 製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うこ とができる。これもの公知の分離、精製法としては、塩 折や镕媒状搬法などの溶解度を利用する方法。透析法、 殿外ろ過法、ゲルろ過法。およびSDSーボリアクリル アミドダル電気体動法などの主として分子量の差を利用 する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の 差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー などの特異的規和性を利用する方法、遂相高速液体クロ 20 マトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電 点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用 wond.

【りり34】このようにして得られるタンパク質が遊離 体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに難じ る方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得ち れた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法によ り、遊離体または他の地に変換することができる。な お、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精 り、任意に修飾を加えたり、ボリベプチドを部分的に除 去することもできる。タンパク賞修飾酵素としては、例 えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンド ペプチターゼ、ブロティンキナーゼ、グリコシダーゼな どが用いられる。このようにして生成する本発明の61 i 1 タンパク質またはその塩の活性は、例えばG 1 i 1 結合紀列を持つ二本額DNAへの結合能等を指標に測定 することができる。

【0035】 本発明におけるGlilタレバク質もしる はその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発 40 別におけるG!!1 タンパク質もしぐはその部分ペプチ ドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクロー ナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。 本発明におけるGLi1タンパク質もしくはその部分ペ ブチドまたはその塩(以下、本発明のタンパク賞等と略 記する場合がある)に対する抗体は、本発明のタンパク 質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造 法に従って製造することができる。

【0036】 [モノクローナル抗体の作製] (a) モメクロナール抗体産生締胎の作製

本差明のタンパク質等は、哺乳動物に対して投与により 抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは根体、希釈部 とともに授与される。投与に際して独体産生能を高める ため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイント アジュバントを投与してもよい。 役与は通常2~6週毎 に1回ずつ、計2~10回程度行なわれる。用いられる 哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モル モット。マウス、ラット、ビツジ。ヤギが挙げられる が、マウスおよびラットが好来しく用いられる。モノク ローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫さ れた脳血動物、例えば、マウスから抗体傷の認められた 個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ 節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫維 胞と融合させることにより、モアクローナル抗体産生ハ イブリドーマを振襲することができる。抗血液中の抗体 価の制定は、例えば、後配の標識化タンパク質等と抽血 清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を 制定することにより行うことができる。融合操作は既知 の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法(ネイ チャー (Nature), 256巻, 495頁 (1975 年) 」に従い実施することができる。総合促進剤として は、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセン ダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが 用いられる。骨髄腫御胞としては、例えば、NS-1。 P3U1。SP2/Oなどが挙げられるが、P3U1が 母ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細 胞)数と骨髄腫細胞数との野ましい比率は1:1~2 O:1程度であり、PEG(好ましくは、PEG100 0~PEG6000) が10~80%程度の激度で添加 製養に適当なクンパク賞修飾酵素を作用させることによ 30 され、約20~40℃。好ましくは約30~37℃で約 1~1.0分間インキュベートすることにより効率よく細 胞融合を実施できる。

> 【0037】モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの スクリーニングには種々の方法が使用できるが、例え ば、タンパク質等の抗原を直接あるいは組体とどもに吸 着させた個相(例、マイクロブレート)にハイブリドー マ培養上精を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識 した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞 がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いら れる)またはプロテインAを加え、圏相に結合したモノ クローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体 またはプロテインAを吸着させた個相にハイブリドーマ 培養上清を添加し、放射性物質や群素などで複識したタ ンパク賞等を加え、個相に結合したモノクローナル抗体 を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体 の避別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行う ことができるが、通常はHAT(ヒポキサンチン、アミ ノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用増地など で行うことができる。選別および脊髄用培地としては、

50 ハイブリドーマが生育できるものならばどのような熔体

を用いても異い。例えば、1~20%、好ましくは10 ~20%の牛胎児血潜を含むRPMI 1640培地、 1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工 業(株))またはハイブリドーマ培養用無血清培庫(S FM-101。日水製薬(株))などを用いることがで きる。羇養羅度は、通常20~40℃、好ましくは約3 7℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましく は1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下 で行うことができる。ハイブリドーマ培養上替の抗体循 は、上記の抗血清中の抗体循の額定と同様にして制定で 10 密る。

【0038】(b) モノクロナール抗体の精製 モノクローナル抗体の分離精製は、通常のボリクローナ ル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法 〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点次殿法、電気 体動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着 法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合調相またはプロテ インAあるいはプロデインGなどの話性吸着剤により抗 体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精 製法〕に従って行うことができる。

【0039】 (ポリクローナル抗体の作解) 本発明のポ **リクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に** したがって製造することができる。例えば、免疫抗原 (タンパク質等の抗原)とキャリアータンパク質との複 合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と飼 様に哺乳動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタ ンパク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離 精製を行うことにより製造できる。哺乳動物を免疫する ために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との 複合体に関し。キャリアータンパク質の種類およびキャー30 リアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架構させ て免疫したハブテンに対して抗体が効率食くできれば、 どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例 えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キ 一ホール・リンペット・ペモンアニン等を重量比でハブ デン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5*の* 翻合でカブルさせる方法が用いられる、また、ハブテン とキャリアーのカプリングには、種々の総合剤を用いる ことができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミ ド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリ ジル基を含有する活性エステル鉄薬等が用いられる。縮 合生成物は、温血動物に対して、抗体確生が可能な部位 にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。 投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイント アジュバントや不完全フロイントアジュバントを殺与し てもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約 3~10回程度行うことができる。ポリクローナル抗体 は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水な ど、好ましくは血液がら採取することができる。抗血清

体価の測定と関縁にして測定できる。ボリクローナル抗 体の分離結製は、上記のモノクローナル抗体の分離結製 と同様の免疫グロブリンの分離特製法に従って行うこと ができる。

【0040】(1) G111タンパク質、その部分ペプ チドまたはそれらの塩、または酸タンパク質またはその 部分ペプチドをコードするDNAは骨・軟骨分化誘導剤 として有用である。

(2) G 1 + 1 タンパク質、その部分ペプチドまたはそ れらの塩、GIII遺伝子DNAもしくはその相雑DN Aまたはその部分DNAおよびGlilタンパク質また はその部分ペプチドを発現する能力を有する緩和は、G 1 1 1 遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物、G 1i1遺伝子のブロモーターもしくはエンバンサーの語 性を制御する作用を有する化合物。ひいては骨・軟骨分 化顕節作用を有する化合物等のスクリーニングに用いる ことができる。

(3) G i i l 遺伝子のアンチセンスDNA等は、所謂 遺伝子治維荊(骨・軟骨分化阻害剤または骨・軟骨形成 過剰症の予防・治療剤)として。または遺伝子診断剤 (骨・軟骨疾患の診断剤)などとして有用である。

(4) G 1 f 1 タンパク質、その部分ペプチドまたはそ れらの塩の抗体は骨・軟骨疾患の診断剤として有用であ

Glilカンパク質もしくは部分ペプチドまたはその報 (以下、本発明のタンバク質等と略能する場合があ る)、G 1 iiタンパク質またはその部分ペプチドをコ ードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合 がある)。GIi1タンパク質等に対する拡体(以下。 本発明の抗体と略記する場合がある)、Glil遺伝子 のアンチセンスDNAの用途等について、以下に具体的 に説明する。

[0041] (1) 骨·軟骨分化誘導剂

**ΦG111**タンパク質、その部分ペプチドまたはそれら の塩、または該クンパク質またはその部分ペプチドをコ ードするDNAは骨・軟骨分化誘導剤などの医薬として 使用することができる。例えば、生体内においてG18 エタンパク質またはヘッジホッグが減少しているため に、またはヘッジホッグによるシグナルが有効に伝達さ れないためにG 1 i 1 激伝子またはその産物よる生理作 用(転写活性、骨・軟骨分化誘導作用など)が期待でき ない (譲G1 | 1 タンパク質の欠乏症) 患者がいる場合 に、OG 1 i 1タンパク質等を該患者に投与し級タンパ ク質の量を補充したり、②(イ)本発明のタンパク質を コードするDNAあるいは該DNAを含有する組換えべ クターを該選者に数与し発現させることによって、ある いは(ロ)対象となる細胞(例えば、グリア細胞、骨髄 細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨 細胞もしくは骨芽細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、 宇のボリクローナル抗体師の測定は、上記の血清中の抗 50 幹細胞等)に本発明のタンパク質をコードするDNAを

挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植すること などによって、患者の存的におけるG1 11 タンパク質 の業を増加させ、転写活性、骨・軟骨分化誘導作用を充 分に発揮させることができる。すなわち、本発明のタン バク質または該タンパク質をコードするDNAは、安全 で低毒性な骨・軟骨分化誘導剤として有用である。本発 明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNA は昔・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患(例、骨 折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損 傷、外傷、腫瘍擴出などによる骨、軟骨欠損部の再生、 脊椎固定衡、脊柱管拡大術などの骨再種、骨形成不全 在、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患) . 歯科領 域の変象 (例、口微製、下類骨再建筑、前槽等形成循及 どの骨再建)、骨粗鬆症などの予防・治療額などの医薬 として用いることができる。また、美容外科領域におけ る骨移植の治療剤などの医薬としても用いることができ るし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤とし ても利用できる。本発明のタンパク質を上記予防・治療 剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化する ことができる。一方、本発明のタンパク質をコードする 20 DNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある) を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のD NAを単独あるいはレトロウイルスペクター、アデノウ イルスペクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイ ルスペクターなどの適当なベクターに挿入した後、常養 手段に従って実施することができる。本発明のDNA は、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とと もに、遺伝子鏡やハイドロゲルカアーテルのようなカテ ーテルによって投与できる。例えば、〇本英明のタンパ ク質または**②**該タンパク質をコードするDNAは、必要 30 に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル 剤、マイクロカブセル剤などとして経口的に、あるいは 水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性 溶液。または無器液剤などの注射剤の形で非経口的に使 用できる。例えば、①本発明のタンパク質または②該タ ンパク質をコードするDNAを生理学的に認められる公 知の祖体、香味剤、賦形剤、ベビクル、防腐剤、安定 剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要 求される単位用量形態で混和することによって製造する ことができる。これら製剤における有効成分量は指示さ

れた範囲の適当な用量が得られるようにするものであ

がカブセルである場合には、上電タイプの材料にさらに 抽脂のような被状担体を含有することができる。注射の ための無菌組成物は注射用水のようなベモクル中の活性 物質、胡麻油、椰子油などのような天然能出植物油など を溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って 処方することができる。注射用の木性液としては、例え ば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等築 液(例えば、Dーソルビトール、Dーマンニトール、塩 化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助 網、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアル コール(例、プロビレングリコール。ボリエチレングリ コール)、非イオン性異面活性剤(例、ポリソルベート 80°、HCO一50)などと併用してもよい。油性液 としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶

解補助剤である安息等酸ペンジル、ペンジルアルコール

などと併用してもよい。

【0043】また、上配予防・治療剤は、例えば、緩衝 割く例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝 液)、無端化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸 プロカインなど)、変定剤(例えば、ヒト血清アルブミ ン、ボリエチレングリコールなど)、保存額(例えば、 ベンジルアルコール、フェノールなど)、機化防止剤な どと配合してもよい。御製された注射被は通常、適当な アンプルに充壌される。このようにして得られる製剤は 安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物(例えば、 とも、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、 ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができ る。本発明のタンパク質の投与量は、投与対象、対象線 器、症状、教与方法などにより差異はあるが、経口技事 の場合、一般的に例えば、軟骨損傷患者(60kgとし て)においては、一日につき約0、1mg~100m g、母ましくは約1,0~50mg、より好ましくは約 0~20mxである。非経口的に役与する場合は、 その1回役与量は投与対象、対象機器、症状、投与方法 などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常 例えば、軟骨損傷患者(60kgとして)においては、 一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約 0.1~20mg程度、より好ましくほ約0、1~10 mg程度を参照注射により殺与するのが昇都合である。 他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与 することができる。本義朝のDNAの投年競は、投与何 象、対象職器、症状、投与力法などにより差異はある が、経口投与の場合、一般的に例えば、軟骨損傷患者 (60kgとして) においては、一日につき約9.1m g~100mg、好ましくは約1,0~50mg、より 好ましくは約1、0~20mgである。非経口的に役与 する場合は、その1回投与量は投与対象。対象職器、症 状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注針剤 の形では適常例えば、軟骨損傷患者(60kgとして)

ましくは約0.1~20mg程度。より好ましくは約 0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好 都合である。他の動物の場合も、60kk当たりに換算 した量を投与することができる。

【0044】(2) **②**Glil遺伝子の発現を制御する 活性を有する化合物、OGIII遺伝子のプロモーター もしくはエンハンサーの話性を振舞する作用を有する化 合物または30首・軟骨分化調節作用を有する化合物のス クリーニング方法

上記したごとく、GIi1タンパク質、その部分ペプチ 10 下またはそれらの媒、Glil激伝子DNAもしくはそ の相補DNAまたはその部分DNAおよびGlilpン パク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する 細胞は、Glil遺伝子の発現を制御する特性を有する 化合物やG lil激伝子のプロモーターもしくはエンハ ンサーの活性を制御する作用を有する化合物等のスクリ ーニングに用いることができ、ひいては骨・軟骨分化網 節作用を有する化合物のスクリーニングに用いることが できる。GTi1遺伝子を発現する能力を有する細胞と しては、湿血動物(例えば、たト、モルモット、ラッ ト、マウス、ニフトリ。ウサギ、ブタ、モツジ、ウシ、 サル等)の細胞(例えば、グリア細胞、骨髄細胞、表皮 御窓、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨細胞もしく は骨芽細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もし くはガン細胞等)が用いられる。特に、骨または軟骨へ の分化能を有する細胞あるいは既に分化形態を示してい る細胞が好ましく、軟骨細胞、繊維芽細胞(例、マウス 繊維芽細胞株C3H1OT1/2)。筋芽細胞(例)マ ウス筋芽細胞株C2C12)などがより好ましい。

【0045】以下に、本発明のG1:1遺伝子の発現を 制御(促進または阻害)する活性を有する化合物または その塩のスクリーニング方法について詳述する。 G1卡 1遺伝子発現はヘッジホッグと呼ばれる可溶性タンパク 質によるシグナル伝递によって誘導され、骨形成を誘導 し、骨・軟骨分化促進活性を有するため、GII1遺伝 子の疑規を促進する活性を有する化合物またはその塩 は、骨・軟骨分化器節(特に促進)作用を有し、骨・軟 青灰忠、例えば整形外科領域の疾患(例、骨折、変形性 関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷。外傷、臓 瘍摘出などによる骨、軟骨欠損部の再生。脊椎固定術、 脊柱管拡大術などの管両建、骨形成不全症、軟骨無形成 症などの先天性骨・軟骨疾患)、歯科領域の疾患(例、 白菱製、下顎骨再建衛、歯槽堤形成断などの骨再建)、 普粗鬆症などの予防・治療剤などの医薬として用いるこ とができる。また、美容外科領域における骨移植の治療 翔などの医薬としても用いることができるし、再生医療 における自家移植の際の分化誘導剤としても利用でき る。一方、G I i 1 撤伝子の発現を阻塞する活性を有す る化合物またはその塩は、骨・軟骨分化調節(特に阻

・予防剤などの医薬として使用できる。したがって、G 1112ンパク質。その部分ペプチドまたはそれらの 塩、Glil 遺伝子DNAもしくはその相補DNAまた はその部分DNAまたはGlil電伝子を発現する能力 を有する細胞は、G 1 i 1遺伝子の発現を制御(促進ま たは緊密)する活性を有する化合物またはその塩のスク リーニング、ひいては骨・軟骨分化凝縮作用を有する化 合物のスクリーニングのための材料として用いることが できる。

【0046】すなわち、本発明は、QG111激伝子を 発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養 し、GT i 1 遺伝子DNAもしくはその相類DNAまた はその部分DNAを用いてGI i 1タンパク質をコード するmRNA(以下、GlilmRNAと略称する場合 がある。)の量を測定することを特徴とするG141湯 伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩 のスクリーニング方法、より具体的には、②(1) G 1 11遺伝子を発現する能力を有する細胞を培養した場合 のGlilmRNAの発現量と、(ii)Glil機伝 子を発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に 培養した場合のG L T 1 mRNAの量との比較を行う ことを特徴とする。GII1遺伝子の発現を制御する活 性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を 提供する。Glil激伝子を発現する能力を有する細胞 としては、例えば、袖記したGI 11遺伝子を発現する 能力を有する公知の温血動物細胞などがあげられる。G 1 i T遺伝子を発現する能力を有する公知の温血動物網 胞としては、例えば、骨または軟骨への分化能を有する 細胞あるいは既に分化形態を示している細胞が好まし く、具体的には軟骨細胞。繊維芽細胞(例、マウス繊維 券細胞株C3H10T1/2)、筋芽細胞(例、マウス 箭芽細胞株C2C12) などが用いられる。G1:12激 伝子を発現する能力を有する細胞の培養は、公知の動物 郷胞培養法と開檬にして行われる。例えば、培地として は、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイ エンス (Science) 、122巻、501(1952)) 、 DMEM増進(ヴィロロジー (Virology) 、8巻、39 6(1959)), RPMI1840焙塘 (ジャーナル・ オブ・ザ・アメリカン・メディカル、アソシエーション (The Journal of the American Medical Associatio n) 199巻, 519(1967)), 199焙地 (プロ シージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バ イオロジガル・メディスン (Proceeding of the Societ y for the Biological Medicine), 73%, 1(195 (0)) 等が用いられる。nHは約6~8であるのが好ま しい。培養は通常約30~40℃で約15~60時間行 い、必要に応じて通気や撹拌を加えてもよい。発現誘導 剤を接触させることによってGIi1遺伝子が発現する 動物細胞を用いる場合には、該動物細胞を発現試事剤の 審)作用を有し、例えば青・軟骨形成過剰症などの治療 50 存在下または非存在下で培養することができる。

【0047】mRNAの発現量の比較をハイブリダイゼ ーション油によって行うには、公知の方法あるいはそれ に準じる方法、例えば、モレキュラー・クローエング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sembrook et al., Col d Spring Barbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に 従って行うことができる。具体的には、GLi1タンバ ク質をコードするmRNAの量の稠定は、公知の方法に 従って細胞から抽出したRNAとGlil遺伝子をコー ドするDNA(Glil選係子DNA)もしくはその相 額DNAまたはその部分DNAとを接触させ、G1i1 遺伝子DNAまたけその相補DNAに結合したmRNA の量を測定することによって行われる。GIII遺伝子 DNAの報補DNAまたはその部分DNAを、例えば放 射性同位元素、色素などで構識することによって、G 1 i 1遺伝子DNAの相補DNAに結合したG i i 1mR NAの量が容易に測定できる。放射性同位元素として は、例えば"ア、、日などが用いられ、色素としては、 例文はfivorescein, FAM (PE Biosystems社製)、 ] OE (PE Biosystems批製)、TAMRA (PE Biosyste ao社製)、ROX (PD Biosystems社製)、Cy 5 (Ame 20 richane社製)、CyS (Americhan社製) などの催光色素 が用いられる。また、GIilmRNAの葉は、細胞か ら抽出したRNAを連続写酵素によってcDNAに要核 した後、GIEI遺伝子をコードするDNAもしくはそ の相緒DNAまたほその部分DNAをプライマーとして 用いるPCRによって、増報されるcDNAの量を制定 することによって行うことができる。GI f 1mRNA の量の制定に用いられるGIII激伝子DNAの相補D NAとしては、Glil遺伝子DNA(上鎖)に相補的 な配列を有するDNA(下鎖)があげられる。GLi1 遺伝子DNAの部分DNAとしては、例えばGLi1歳 伝子DNAの塩基配列中、連続した10~2200個程 度、好ましくは10~300個程度、さらに好ましくは 1 6~3 0 個程度の塩基がら構成される塩基配列があげ られる。Gliia強伝子DNAの相補DNAの部分DN Aとしては、例えば触記したGlilDNAの部分DN Aに相補的な配列を有するDNAがあげられる。即ち、 倒えばGlil選伝子DNAの塩基配列中、連続した1 0~2200觸程度、好ましくは10~300個程度。 さらに好ましくは10~30個程度の塩基から構成され 40 る塩基配列に相補的な配列を有するDNAがあげられ る。PCRに用いられるプライマーとしては、例えば観 列番号:1で表される塩基配列を含有するDNAおよび 配列番号:2で変される塩基配列を含有するDNAなど があげられる。Glil mRNAの量を増加させる試 験化台物を、G l j j 遺伝子の発現を促進する活性を有 する化合物あるいは骨・軟骨分化調節 (特に促進) 作用 を有する化合物として選択することができ、またGIi 1 mRNAの量を減少させる試験化合物を、GIII

・軟骨分化機節(特に阻害)作用を有する化合物として 選択することができる。

【0048】上記**②**~②に示したスクリーニング方法に おいて試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパ ク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、 細胞抽出液、額物抽出液、動物組織抽出液などが挙げら れ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公 知の化合物であってもよい。

【0049】また、本発明は、〇0111の公知プロモ 一ターやエンハンサー領域をゲノムDNAよりクローニ ングし、適当なレポーター遺伝子の上流に連結させたD NAで形質転換した細胞(例えば、軟骨細胞、繊維芽細 題(例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2)、新 芽細胞 (例、マウス筋芽細胞株C2C12) など) を試 験化合物の存在下で培養し、G1 i 1 の発現に代えてレ ボーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする。G 1 i 1 遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活 性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリ ーニング方法、ひいてはG l i l 遺伝子の発現を制御す る活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方 弦を提供する。レポーター遺伝子としては、例えば、1 a c Z (ガーガラクトングーゼ遺伝子) などの発色マー カー遺伝子等などが用いられる。レポーター遺伝子配物 (例、mRNA、タンパク質)の量を公知の方法を用い て糖定することによって、レポーター遺伝子産物の量を 増加させる試験化合物をGlij遺伝子のプロモーター もしくはエンハンサーの活性を制御 (特に促進) する作 用を有する化合物、すなわちGLi1遺伝子の発現を促 進する話性を有する化合物として選択でき、逆に、レポ ーター遺伝子産物の量を減少させる試験化合物をG Li 1 遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの話性を 網御(特に阻害)する作用を有する化合物、すなわちび 1 i 1遺伝子の発現を阻害する結性を有する化合物とし て選択することができる。試験化合物としては、前記と 同様のものが使用される。細胞の熔養は、公知の動物網 腹培養と同様に行うことができる。

Aに相補的な疑例を育するDNAがあげられる。即ち、例えばGlil選伝子DNAの塩基配列中、連続した10~2200個程度、好ましくは10~300個程度。 200個程度の塩基から構成られる。 PCRに用いられるプライマーとしては、例えば配列番号:1で表される塩基配列を含有するDNAがあげられる。 PCRに用いられるプライマーとしては、例えば配列番号:1で表される塩基配列を含有するDNAがあげられる。 PCRに用いられるプライマーとしては、例えば配列番号:2で表される塩基配列を含有するDNAなどがあげられる。 Glil mRNAの量を増加させる試験化合物を、Glil mRNAの量を増加させる試験化合物を、Glil mRNAの量を増加させる試験化合物を、Glil mRNAの量を増加させる試験化合物を、Glil mRNAの量を減少させる試験化合物を、Glil mRNAの量を減少させる試験化合物を、Glil mRNAの量を減少させる試験化合物を、Glil mRNAの量を減少させる試験化合物を、Glil であるとができ、またGlil mRNAの量を減少させる試験化合物を、Glil であるとができ、またGlil mRNAの量を減少させる試験化合物を、Glil であるとができ、またなli できる。 なli で であると mana で であると mana で できる。 なli で であると mana で であると mana で であると mana で できる。 なli で であると mana で m

量を減少させる試験化合物を、骨・軟骨分化調節(特に 阻害)作用を有する化合物として選択することができ る。試験化合物としては、前記と同様のものが使用され る。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うこ とができる。

【0051】また、本発明は、②GIIIクンパク質またはその部分ペプチトを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下れよび非存在下に培養し、細胞の軟骨分化状態、例えば軟骨分化マーカーの発現を測定することを特徴とする骨・軟骨分化調節(促進または阻害)作 10 用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。試験化合物としては、前記と回樣のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0052】さらに、G1i1タンパク質はG1i1液 伝子自身の転写あるいは、脳もしくは肺の分化に関与するHNF-35変伝子の転写を誘導していると報告されている。したがって、例えば上記した②または②のスクリーニング方法を実施することにより直接的にG1i1タンパク質の転写活性を測定できるか、またはHNF-38を発現し得る細胞株を用いれば例えば上記した③または②に記載の方法に準じてHNF-35のmRNAの発現量を試験化合物の存在下および非存在下で測定し、比較することによりG1i1タンパク質の転写活性を測定することも可能である。

【0063】本発明のスクリーニング用キットには上部スクリーニング方法を実施するため、上記のG1iタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、またはG1i1遺伝子またはその廃生物を産生する能力を有する細胞、またはG1i1遺伝子発現レポーターペクターを30 導入した細胞(Gil1遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞)、およびGli1遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを含有するものである。

【0054】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物。例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、台成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから 40 選ばれた化合物であり、Glil遺伝子の発現を制御

(促進または風害) する活性を有する化合物あるいはG i i l 遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの語 性を制御(促進または阻害) する作用を有する化合物、 ひいては骨・軟骨分化瀕節作用を有する化合物である。 該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、 無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩)等との 塩が挙げられる。G l i l 遺伝子の発現を促進する活性 を有する化合物(またはG l i l 遺伝子のが好 を有する化合物を経口役与する場合、一般的に成人(体 類60kgとして)においては、一日につき該化合物を 類60kgとして)においては、一日につき該化合物を 類60kgとして)においては、一日につき該化合物を 数0、1~100mg、好ましくは約1、6~50m 裏、より好ましくは約1、6~20mg 投与する。非経 もしくはエンハンサーの活性を促進する作用を有する化 50 D的に投与する場合は、該化合物の1回役与量は投与対

合物、骨・軟骨分化誘導作用を有する化合物)またはその塩は、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患

(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎。半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍補出などによる骨、軟骨欠損部の再生、脊椎固定衛、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)。歯科領域の疾患(例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成節などの背再進)、骨粗鬆症などの予防・治療剤などの医薬として用いることができる。また、美容外科領域における骨移域の治療剤などの医薬としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。一方、G i i i 遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物(またはG i i i 遺伝子のブロモーターもしくはエンハンサーの活性を阻害する作用を有する化合物。またはその協は、例えば骨・軟骨形成過剰症などの治療・予防剤などの医薬として使用できる。

【0055】本発明のスクリーニング方法またはスクリ ーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療 ・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施す ることができ、例えば、錠剤、カプセル剤。エリキシル 剤、マイクロカブセル剤、無菌性溶液、粘濁液剤などと して、経口的または非経口的に費与することができる。 このようにして得られる製剤は安全で低器性であるの。 で、例えば、湿血動物(例えば、ヒド。マウス、ラッ ト、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、 イヌ、サル、チンパンジーなど:好ましくは哺乳動物) に対して投与することができる。該化合物またはその権 の殺与難は、その作用、対象疾患、投与対象、殺与ルー トなどにより差異はあるが、例えば、軟骨損傷の治療目 的でG 1 i 1遺伝子の発現を促進する活性を有する化合 物を経口投与する場合、一般的に成人(体重ものkgと して) においては、一日につき談化合物を約0.1~1 Oomg、好ましくは約1.0~50mg、より好変し くは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する 場合は、豚化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患な どによっても異なるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で G1 i 1遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物を 注射剤の形で通常成人(50kgとして)に投与する場 台、一日につき該化台物を約0.01~30mg程度、 好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約 0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好 都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算 した量を投与することができる。一方、骨・軟骨形成過 劉旋の治療目的でG1i1歳伝子の発現を阻害する活性 を有する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体 類60kgとして)においては、一日につき篩化合物を 約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50m g、より好ましくは約1、0~20mg投与する。非経

象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、骨・軟 骨形成過剰組の治療目的でG 1 1 遺伝子の発現を阻害 する活性を有する化合物を注射剤の形で適常成人(6 0 kgとして)に投与する場合、一目につき該化合物を約 0.01~30mg程度、母ましくは約0.1~20m g程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈 注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合 も、60kg当たりに損算した最を投与することができる。

【0056】(3) アンチセンススクレオチドを含有す 10 る医薬(骨・軟骨分化阻害剤)または診断剤(骨・軟骨 疾患の診断剤)

本発明で用いられるDNAに相補的に結合し、前記DN Aの発現を伸制することができる本発明で用いられるア ンチセンスヌクレオチド(例、アンチセンスDNA) は 低素性であり、生体内における本発明で用いられるタン パク質または本発射で用いられるDNAの機能抑制する ことができるので、例えば、骨・軟骨形成過剰症などの 治療・予防剤などとして使用することができる。上記ア ンチセンスヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使 20 用する場合、公知の方法に従って製剤化し、投与するこ とができる。例えば、前記アンチセンスヌクレオチドを 用いる場合、前記アンチセンスヌクレオチドを単独ある いはレトロウイルスペクター、アデノウイルスペクタ ー、アデノウイルスアンシエーテッドウイルスペクター などの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従っ て、温血動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサ ギ。ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ。サ ル、チンパンジーなど、好ましくは哺乳動物)に対して 経口的または非経口的に数与することができる。前記ア ンチセンスヌクレオチギは、そのままで、あるいは摂取 促進のために補助剤などの生理学的に認められる祖体と ともに製剤化し、適価子錠やハイドログルカサーテルの ようなカテーテルによって投与できる。前犯アンチセン パスクレオチドの教与量は、対象疾患、投与対象、役与 ルートなどにより差異はあるが、例えば、骨・軟骨形成 過剰症の治療の目的で本発明で用いられるアンチセンス スクレオテドを経口投与する場合。成人(体業60k g) に対し、一日につき前配アンチセンスヌクレオチド を約0. 1~100mg 接与する。さらに、前能アンチ 40 センスヌクレオチドは、組織や細胞における本発明で用 いられるDNAの存在やその発現状況を調べるための診 | 頻用オリゴヌクレオチドブローブとして使用することも できる。主記アンチセンスヌクレオチドと開機に、二本 級RNA、リボザイム、デコイオリゴヌクレオチドなど も、前記DNAの発現を抑制することができ、生体内に おける本英明で用いられるタンパク質または本業明で用 ViられるDNAの機能抑制することができるので、例え ば、骨・軟骨形成器對症の予防・治療解などとして使用 することができる。二本総RNAは、公知の方法(例、

Nature, 411巻、494頁, 2001年)に準じて、本発期で用いられるDNAの転列を基に設計して得られる。リボザイムは、公知の方法(例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年)に準じて、本発期で用いられるDNAの配列を基に設計して得られる。デコイオリゴヌクレオチドは、公知の方法(例、The Journal of Clinical Investigation、106巻、1071頁、2000年)に準じて、本発明で用いられるDNAの配列を基に設計して得られる。Glilは転写图子であるのでGlilの結合配列を含むデコイGlilバインディングオリゴヌクレオチド(例えばS'-GACCACCA-3'(Kinzler KW, Vogelstein B、Mol Cell Biol 1990 Feb;10(2): 634-42)を含有するオリゴヌクレオリドなど)などを有効に使用できる。上記の予防・治療網として使用する場合、公知の方法に従って機関化し、投与することができる。

【0057】(4) 遺伝子診断例

本発列のDNAまたはアンチセンスDNAは、プローブ として使用することにより、哺乳動物(例えば、お卜、 ラット。マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、 イヌ、サルなど)における本発期のタンパク質またはそ の部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異 常(遺伝子異常)を検出することができるので、例え ば、薄DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは 発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発 現満多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明の DNAまたはアンチセンスDNAを用いる上記の遺伝子 診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイセーショ ンやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Generalics). 第5巻、874~879頁(1989年)、ブロシージ ングズ・オブ・ザ・ナジョナル、アカデミー、オブ・サ イエンシイズ・オブ・ユーエスエー (Proceedings of t he National Academy of Sciences of the USA) , 第8 6巻, 2766~2770頁(1989年))などによ り実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダ イゼーションにより本発明のタンパク質またはその部分 ペプチドをコードするmRNAの発現低下が検出された 場合は、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の 疾患(例、骨折、变形性関節症、骨関節炎、半月板損傷 等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症など - の先天性骨・軟骨疾患)、歯科領域の疾患(例、日蓋 製)、智和鬆症などの疾患である可能性が高いまたは特 来罹患する可能性が高いと診断することができる。--方、ノーザンパイプリダイゼーションにより本発明のタ ンパク質またはその部分ペプチドをコードするmRNA の発現過多が検出された場合は、例えば、骨・軟骨形成 過剰症などの疾患である可能性が高いまたは特楽罹患す る可能性が高いと診断することができる。

【0058】 (5) G111 タンパク質、その部分ペプ チドまたはそれらの塩の抗体を用いた診断剤

80 G1 i 1 タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの

端の統体(以下。本発明の抗体と略称する場合がある) は、本差明のタンパク質等を特異的に認識することがで きるので、被検波中の本発明のタンパク質等の定量、特 にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用するこ とができる。すなわち、本発明は、例えば、(i) 本発 明の抗体と、被検検および標識化タンパク質等とを競合 的に反応させ、該抗体に結合した標識化タンパク質等の 割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタ ンパク質等の定量法、(ii) 被稿級と担体上に不溶化し た本発明の拡体および標準化された本発明の拡体とを同 10 時あるいは連続的に反応させたのち、不熔化担体上の標 識別の話性を測定することを特徴とする被検波中の本発 明のタンパケ質等の定量法を提供する。上記(G)にお いては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のN端部を 認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等の C端部に反応する抗体であることが好ましい。

【0059】本発明のタンパク質等に対するモノクロー ナル銃体(以下、本発明のモノクローナル抗体と称する 場合がある)を用いて本発明のタンパク質等の測定を行 なえるほか、組織染色等による検出を行うこともでき る。これらの目的には、独体分子そのものを用いてもよ く、また、抗体分子のF(a b')。、F a b'、あるいは Faも両分を用いてもよい。本発明のタンパク質等に対 する抗体を用いる瀕寒法は、特に制限されるべきもので はなく、被測定液中の抗原量(例えば、タンパク質量) に対応した抗体、抗原もしるは抗体一抗原複合体の量を 化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の 抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出す る脚定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例 えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法お 30 まびサンドイッチ法が好適に用いられるが、必度、特異 性の点で、後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特 に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識 剤としては、例えば、放射性間位元素、酵素、蛋光物 質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素として は、例えば、(\*\* 1) 、(\*\* 1) 、(\*H) 、

f C) などが用いられる。上記酵素としては、安定で 比話性の大きなものが好ましく、例えば、ヨーガラクト シダーゼ、βーグルコシダーゼ、アルカリフォスファタ 一ゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用 40 いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミ ン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられ る。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノー ル誘導体、ルシフェリン。ルンゲニンなどが用いられ る。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオ チンーアビジン系を用いることもできる。

【0060】抗原あるいは抗体の不熔化に当っては、物 理要着を用いてもよく。また通常、タンパク質あるいは 酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を

ス、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ボ リスチレン、ボリアクリルアミド、シリコン等の合成物 脂、あるいはガラス等が用いられる。サンドイッチ法に おいては不熔化した本発明のモノクローナル抗体に紡績 液を反応させ(1次反応)、さらに擦鐵化した本発明の モノクローナル抗体を反応させ(2次反応)た後、不容 化担体上の標識剤の活性を測定することにより被論級中 の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次 反応とる次反応は遊の順序に行なっても、また、同時に 行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識 化額および不溶化の力法は上記のそれらに準じることが できる。また、サンドイッチ法による免疫制定法におい て、関相用植体あるいは標識用植体に用いられる抗体は 必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を由上させ る等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよ い。本発明のサンドイッチ法によるタンパク質等の衝定 法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明 のモノクローナル抗体はタンパク質等の結合する部位が 相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反 応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反 応で用いられる抗体が、タンパク質のC機器を認識する 場合、「次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部 以外、例えばN聯部を認識する抗体が用いられる。

【0061】本発明のモノクローナル抗体をサンドイッ チ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメト リック法あるいはネフロメトリーなどに用いることがで きる。競合法では、被検波中の抗原と標識抗原とを抗体 に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と (F) と抗体と結合した標識抗原(B) とを分離し(B) **/F分攤)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液** 中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可答 性抗体を用い、B/F分離をボリエチレングリコール、 上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、およ び、第1試体として関相化抗体を用いるか、あるいは、 第1 抗体は可溶性のものを用い第2 抗体として調和化抗 体を用いる陽極化独とが用いられる。イムノメトリック 法では、被検液中の抗原と腸卵化抗原とを一定量の標識 化抗体に対して競合反応させた後間相と紛相を分離する か、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化拡体と を反応させ、次に周相化技原を加え未反応の標識化粧体 を固相に結合させたのち、固相と適相を分離する。次 に、いずれかの相の標識量を選定し被検液中の抗原量を 定能する。また、ネフロメトリーでは、グル的あるいは 溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の 量を測定する。被検統中の抗原量が僅かであり、少量の **沈降物しか得られない場合にもレーザーの数割を利用す** るレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0062】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測 定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の 用いる方法でもよい。根体としては、例えば、アガロー 50 設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の

条件。操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発 例のタンパク質等の概定系を構築すればよい。これらの 一般的な技術手段の詳細については、総説、成巻などを 参照することができる〔例えば、入れ「覚觸「ラジオイ ムノアッセイ: (諸篆社、関和49年発行)、入江 寛 綴「統ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発 行)、石川栄治ら綴「酵素免疫測定法」(医学書院、昭 和53年発行)、石川染物ら綴「酵素免疫測定法」(第 2版) (医学書院、昭和57年発行)、石川栄拾ら綴 「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年 10 発行)。「メソッズ・イン・エンザイモノジー(Method s in ENZYMELOCY) | Vol. 70 (Immunochemical Techniqu es(Part A)), [5] W Vol. 73 (Immunochemical Technism es(Part E)), FIS Vol. 74 (Immunochemical Technique es(Part C)), MW Vol. 84 (Isssunochemical Technical es(Part D:Selected Immanoassavs)), FFW Vol. 92(I assumochemical Techniques (Part E: Monoclonal Angibod ies and General Immunoassay Methods)), 582 Vol. 121 (immunoclussical Techniques (Part 1: Hybridoma Tec hoology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミ ックプレス社発行)など参照し、以上のように、本発明 の植体を用いることによって、本発明のタンパク貿等を 越度鳥く定量することができる。さらに、本発明の抗体 を用いて、生体内での本発明のタンパク質等を定量する ことによって、上記したような各種骨・軟骨痕患の診断 をすることができる。例えば、上記の定量法を用いるこ とにより本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの 濃度減少が検出された場合は、例えば、骨・軟骨疾患。 例えば整形外科領域の状態(例、骨折、菱形性関節症、 骨関節炎、半月報損傷等の軟骨損傷。外傷、骨形成不全 20 症。軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)、歯科領 域の疾患(例、口蓋裂)、骨粗鬆症などの疾患である可 能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断する ことができる。一方、上記の定番法を用いることにより 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの濃度上昇 が輸出された場合は、例えば、骨・軟骨形成過剰症など の疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が

【0063】(6) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質等をコードする DNA (以下、本発明の外来性DNAと略記する) また はその変異DNA (本発明の外来性変異DNAと略記す る場合がある)を有する非ヒト哺乳動物を提供する。す

高いと診断することができる。また。本発用の抗体は、

体液や組織などの被検体中に存在する本発明のクンパク

質等を特異的に検出するために使用することができる。

また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する

液体カラムの作製。精製時の各分画中の本発明のタンパ

ク質等の検出、被検鏈施内における本発明のタンパク質

の筆動の分析などのために使用することができる。

その変異DNAを有する非とト哺乳動物、(2) 非ヒト 補乳動物がゲッ衡動物である第(1)記載の動物。(3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の 動物、および(4)本発明の外来性DNAまたはその変 異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換え ベクターを提供するものである。本発明の外来性DNA またはその変異DNAを有する非ヒト暗乳動物(以下、 本発明のDNA転移動物と略記する)は、未受精卵、受 精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対 して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生にわける胚発 生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞 の段階でかつ一般に8額胞期以前)に、リン酸カルシウ ム法、電気パルス法、リボフェクション法、罷集法、マ イクロインジェクション後、パーティクルガン徳、DE AEーデキストラン弦などにより目的とするDNAを転

義、組織培養などに利用することもでき、さらに、これ る細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合 させることにより本発明のDNA転移動物を作出するこ ともできる。 【0064】非ヒト哺乳動物としては、例えば、クシ、

移することによって作出することができる。また、該ひ

NA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞な

どに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培

ブタ、ヒツジ。ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモッ ト、ハムスター、マウス。ラットなどが用いられる。な かでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生およ び生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なグッ 歯動物、とりわけマウス(例えば、純系として、C57 BL/6系統, DBA2系統など、交雑系として、B6 C3F1系統。BDF1系統。B5D2F1系統。BA LB/で系統、ICR系統など)またはラット(例え ば、Wister, SDなど)などが好ましい。精乳動 物において発現しうる組換えパクターにおける「輸乳動 物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが 挙げられる。本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動 物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん 哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。 本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの権 基配列に変異(例えば、突然変異など)が生じたもの、 異体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換など が生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含 まれる。該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパ ク質を発現させるDNAを意味し、例えば。正常な本発 期のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させ るDNAなどが用いられる。本発明の外来性DNAは、 対象とする動物と開種あるいは異種のどちらの哺乳動物 由来のものであってもよい。本業別のDNAを対象動物 に転移させるにあたっては、該DNAを動物維絶で発現 させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンスト なわち、本発明は、(1) 本発明の外来性DNAまたは 50 ラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本

発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高 い本発明のDNAを有する各種哺乳動物(例えば、ウサ 平、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット。マ ウスなど)由来のONAを発現させうる各種プロモータ 一の下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコン ストラクト (例、ベクターなど) を対象哺乳動物の受精 脚、個えば、マウス受情卵へマイクロインジェクショシ することによって本発明のDNAを高発現するDNA転 移輸乳動物を作出することができる。

15

【0065】本発例のタンパク質の発現ベクターとして 10 は、大腸菌由来のプラスミド、枯草腐由来のプラスミ ド、酵母由来のプラスミド、よファージなどのバクテリ オファージ。モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィ ルス。ワクシニアウィルスまたはパキュロウィルスなど の動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大鷦鷯曲 来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由 来のプラスミドなどが好ましく用いられる。上記のDN A発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、 O ウイルス(例、シミアンウイルス、サイトメガロウイル ス、モロニー自転摘ウイルス、ICウイルス、乳癌ウイ ルス、ボリオウイルスなど)に由来するDNAのプロモ ーター、♥各種哺乳動物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、 モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来の プロモーター、例えば、アルブミン。インスリンII、 ウロブラキン『1、エラスターゼ、エリスロボエチン。 エンドセリン、筋グレアチンキナーゼ。グリア繊維性酸 性タンパク質ク、グルクチオンSートランスフェラー ゼ、血小板由来成長因子4、ケラチンK1、K10わま びKT4、コラーゲン1型および11型。サイクリック AMP依存タンパク質キナーゼルトサブユニット。ジス 30 トロフィン、酒石酸飯旅性アルカリフォスファケーゼ。 心房ナトリウム和尿性因子、内皮レセプターチロシンキ ナーゼ (一般にTie2と略される) , ナトリウムカリ ウムアデノシン3リン酸化酵素(Na、K-ATPas e)、ニューロフィラメント経験。メタロチオネイン! および11人、メクロプロティナーゼ1組織インヒビタ ---, MHCクラスI抗原 (H-2L) 、H-ras、レ コン、ドーバミンβー水酸化酵素、甲状腺ベルオキシダ ーゼ (TPO) 、ボリベプチド鏡延長陽子1a (EF-1 α)、βアクチン、αおよびβミオシン薫鎖、ミオン 40 ン経験1および2、ミエリン基礎タンパク質。チログロ ブリン、Tby-1、免疫グロブリン、日鎖可変部(V NP)、血清アミロイドPコンボーネント、ミオグロビ ン、トロポニンC、平滑縞αアクチン、プレブロエシケ ファリンA、パメプレシンなどのプロモーターなどが用 いられる。なかでも、企身で高発現することが可能なサ イトメガロウイルスプロモーター、ヒトボリペプチド鎖 延長镊子1a(EF-1a)のプロモーター。とりおよ びニワトリョアクチンプロモーターなどが好適である。

いて目的とするmRNAの転写を終結する配列(一般に ターミネターと呼ばれる)を有していることが好まし く、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各 DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミア ンウィルスのSV40クーミネーターなどが用いられ る。その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現さ せる目的で各DNAのスプライシングシグナル。エンバ ンサー領域。真核DNAのイントロンの一部などをプロ モーター領域の5 ~ 上流、プロモーター領域と翻訳領域 関あるいは翻訳領域の3 下流 に連結することも目的 により可能である。正常な本発明のタンパク質の翻訳領 域は、各種哺乳動物(例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネ コ、モルモット。ハムスター、ラット、マウスなど)由 来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、繊維芽細胞由来DNAお よび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムD NAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲 状腺細胞、繊維芽細胞由来RNAより公知の方法により 調製された相補DNAを原料として取得することが出来 る。また、外来性の異常DNAは、上記の御胞または組

識より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変

暴誘発法により変異した翻訳領域を作製することができ

る。該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコ

ンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および

所望により転写終結節位の上能に連結させる通常の遺伝

子工学的手法により作製することができる。受精卵細胞

段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳

動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように

確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞におい

て、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物

の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに

本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発 明の外来性DNAを受け継いだこの側の動物の主発はそ

の胚芽線胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DN

Aを有する。 【0067】本発明の外来性正常DNAを転移させた非 とト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持 することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼 青環境で維代飼育することが出来る。受精卵細胞段階に おける本発明の外来性DNAの転移は、対象暗乳動物の 胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確 保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において 本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動 物の子孫が全てその胚芽鞭節および体細胞の全てに本発 閉の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発 明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はそ の胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNA を避剰に有する。導入DNAを相関染色体の両方に持つ ボモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配す ることによりすべての子孫が談DNAを過剰に有するよ 【0066】上記ベクターは、DNA転移哺乳動物にお 50 うに整意総代することができる。本発明の正常DNAを

有する非とト韓乳動物は、本発明の正常DNAが高発程 させられており、内在性の正常DNAの機能を促進する ことにより最終的に本発明のタンパク質の機能正進症 (例、転写、骨・軟骨分化誘導などの充進症)を発症する ことがあり、その病態モデル動物として利用することが できる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用い て、本発明のタンパク質の機能充進症や、本発明のタン

バク質が関連する接患の病態機序の解明およびこれらの 疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物 は、遊蹤した本発明のタンパク質の増加症状を有するこ

とから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0058】一方、本発明の外来性異常DNAを有する 弗とト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保 持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼 育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とす る外来DNAを前述のブラスミドに組み込んで無料とし て用いることができる。プロモーターとのDNAコンス トラクトは、通常の遺伝子工学的手法によって作製する。 ことができる。受精卵細胞段階における本発明の異常D NAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の 全てに存在するように確認される。DNA転移後の作出 動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在する ことは、作出動物の子様が全てその胚芽細胞および体細 胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味す る。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の 子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本稿明の異 常DNAを有する。導入DNAを相関染色体の両方に特 つホモザイゴート動物を散得し、この離離の動物を交配 30 することによりすべての子孫が該DNAを有するように 繁殖継代することができる。本発明の異常DNAを有す る非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発果させ られており、内在性の正常DNAの機能を阻害すること により最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応 症となることがあり、その衝離モデル動物として利用す ることができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物 を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性製不応症の 衛態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行な うことが可能である。また、具体的な利用可能性として 40 は、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパ ク側の機能不活性型不体症における本発明の異常タンパ ク質による正常タンパク質の機能限害 (dominant negat ive作用)を解明するモデルとなる。また、本発明の外 来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊難した本発明 のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタ ンパク質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリー エング試験にも利用用能である。

【0089】また、上記2種類の本発明のDNA転移動 物のその他の利用可能性として、例えば、**②**組織培養の 50 30

ための緑胞源としての使用。O本発明のDNA転移動物 の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、ま たはDNAにより発現されたクンパク質組織を分析する ことによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あ るいは活性化するタンパク質との関連性についての解 析、ODNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術に より培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織 からの無路の機能の研究、毎上記憶記載の網胞を用いる ことによる細胞の機能を高めるような整剤のスクリーニ ング、およびの本発明の変異カンパク質を単離精製およ びその核体作製などが考えられる。さらに、本発明のD NA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活 性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に脳離する 疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタ ンパク質に製造する疾患モデルの各職器におけるより詳 郷な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さ もには、終病期による二次的疾患の研究および治療に質 献することができる。また、本発明のDNA転移動物か ら各職器を取り出し、維切後、トリブシンなどのタンパ ク質分解酵素により、遊離したDNA転移郷胞の取得、 その絶義またはその培養細胞の系統化を行なうことが可 能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定 化、アポトーシス。分化あるいは増減との関連性、また はそれらにおけるングナル伝達機構を調べ、それらの異 常を講べることなどができ、本発明のタンパク質および その作用解明のための有効な研究材料となる。さらに、 本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質 の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関 連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査 独および定量法などを用いて、有効で迅速な診疾患治療 **薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。ま** た、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DN A発現パクターを用いて、本発網のタンパク智が関連す。 る疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能であ

【0070】(7) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳 動物胚幹細胞および本発明のDNA展現不全非ヒト哺乳 動物を提供する。すなわち、本発明は、(1) 本発明の DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞。

(2) 数DNAがレポーター遺伝子 (例、大勝歯由来の βーガラクトンダーゼ遺伝子)を導入することにより不 活性化された第 (1) 項記載の胚幹細胞、 (3) ネオマ インン耐性である第 (1) 項記載の胚幹細胞、 (4) 井 ヒト哺乳動物がケン菌動物である第 (1) 項記載の胚幹 細胞、 (5) ゲッ歯動物がマウスである第 (4) 項記載 の胚幹細胞、 (6) 本発明のDNAが不活性化された該 DNA発現不全非ヒト哺乳動物、 (7) 該DNAがレポーター遺伝子 (例、大腸菌由来のβーガラクトンダーゼ 遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レボー

ター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの翻 御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、

(8) 非ヒト哺乳動物がグッ歯動物である第(6) 項記 載の非ヒト哺乳動物。(9) ゲッ歯動物がマウスである 第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および(10)第 (7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポータ 一遷伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のD NAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化 合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0071】本発明のDNAが不活性化された非ヒト輪 10 乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明 のDNAに入為的に変異を加えることにより。DNAの 発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしてい る本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させること により、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能 を育さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称す ることがある) 非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES 細胞と略配する)をいう。非ヒト哺乳動物としては、前 記と同様のものが用いられる。本発明のDNAに人為的 に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手 20 法により該DNA配列の一部又は全部の郵除、他のDN Aを挿入または微操させることによって行なうことがで きる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り 枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能 を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作 類すればよい。本発明のDNAが不活性化された非ヒト 哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不搭性化ES 御胎または本発明のノックアウトES細胞と略配する) の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物 が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分に 30 ネオマイシン顕性遺伝子、ハイグロマイシン顕性遺伝子 を代表とする薬剤顕性遺伝子、あるいは1ecZ(β-ガラクトシダーゼ激伝子)、cat(クロラムフェニコ ールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子) を代表とする レポーター選伝子等を挿入することによりエキソンの機 能を破壊するか、あるいはエキソン側のイントロン部分 に適伝子の毎年を終結させるDNA配列(例えば、ボリ A付加シグナルなど)を挿入し、完全なmRNAを合成 できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊する ように構築したDNA配列を有するDNA餌(以下、タ ーゲッティングベクターと略配する)を、例えば相関維 換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES郷 塾について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA **慰剤をプロープとしたサザンハイプリダイゼーション解** 祈あるいはターゲッティングベクター上のDN A配列と ターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDN A以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPC R法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選 期することにより得ることができる。

Aを不活化させる元のBS解題としては、例えば、前述 のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufuaの方法に準じて新しく樹立したものでも よい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在。一般的 には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的 背景がはっきりしていないので、これに代わる鈍系で免 接学的に遺伝的背景が明らかなES締絶を取得するなど の目的で例えば、CS7BL/6マウスやCS7BL/ 6の採卵数の少なさをDBA/2との交換により改善し tBDF1~9x(C57BL/68DBA/280F 1)を用いて樹立したものなども良好に用いうる。 BD F1マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であると いう利点に加えて、CS7BL/6マウスを青景に持つ ので、これを用いて得られたES細胞は搭盤モデルマウ スを作出したとき、CS7BL/6マウスとバッククロ スすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに 代えることが可能である点で有利に用い得る。また、E S練胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚 盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤 趣まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚 を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞 を用いてもよいが、通常機のES細胞の方が生産系列や メラを作出するのに都合が良い。また、板雑な培養の手 間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行な うことが望ましい。ES細胞の雌雄の制定方法として は、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の 遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例として挙げる ことができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析 をするのに約10°個の御胞数を要していたのに対し て、1コロニー程度のBS細胞数(約50個)で落むの で、培養初期におけるES細胞の第一次ゼレクションを 難雄の判別で行なうことが可能であり、早期に維細胞の 選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に耐 紋できる。

【0073】また、第二次セレクションとしては、例え ば、Gーバンディング法による染色体数の確認等により 行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常 数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の 関係上国難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウト した後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が20 =40である細胞)に再びクローニングすることが望ま しい。このようにして得られた脳幹細胞株は、通常その 増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすい ので、注意深く継代培養することが必要である。例え ば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上 でLIF (1-100001/m) 存在下に炭酸ガス培養 器内(野ましくは、5%旋簸ガス、95%空気または5 %酸素、5%炭酸ガス、90%空気) で約37℃で貯養 するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリブ 【0072】また、相周組換え法等により本発明のDN 50 シングEDTA溶液(通常0、001-0、5%トリブ

51 シン/ 0. 1-5mM EDTA, 好ましくは約0. 1 %トリプシン/1mM EDTA) 処理により単細胞化 し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法な どがとられる。このような糖代は、通常1-3日報に行 なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細 胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが 盟まれる。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至 るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで 浮遊培養することにより、頭頭筋、内臓筋、心筋などの 様々のタイプの細胞に分化させることが可能であり(M. 10 J. Evans及びM. H. Kanfisso, ネイチャー (Nature) 第 292巻、154頁、1981年; 0. R. Martin プロシーディン グス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエン ス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 第78 巻、7634頁、1981年 ; T. C. Doetschmanら、ジャーナル ・オブ・エンプリオロジー・アンド・エクスペリメンタ ル・モルフォロジー、第町巻。27頁、1989年)、本発明 のES総絶を分化させて得られる本発明のDNA発現不 全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の維 脳生物学的検討において有用である。本発明のDNA発 現不全非とト哺乳動物は、蒸動物のmRNA量を公知方 法を用いて測定して開接的にその発現量を比較すること により、正常動物と区別することが可能である。該非セ **下哺乳動物としては、前配と飼様のものが用いられる。** 【0074】本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物 は、例えば、前述のようにして作製したグーゲッティン グベクターをマウス胚幹細胞またはマウス鉛細胞に導入 し、導入によりターゲッティングベクターの本発剤のD NAが不特性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えに より、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の 30 本発明のDNAと入れ採わる相間組換えをさせることに より、本発明のDNAをノックアウトさせることができ る。本発明のDNAがメックアウトされた細胞は、本発 明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプロープと したサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッ ティングペクター上のDNA配列と、カーゲッティング ベクターに使用したマウス由来の本発射のDNA以外の 近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法に よる解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物配幹 細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明 のDNAが平価性化された細胞体をクローニングし、そ の細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動 物胚または胚盤能に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠 させた籐非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された 動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変 製した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成さ れるキメラ動物である。該キメラ動物の生産細胞の一部 が変異した本発明のDNA席をもつ場合、このようなキ

メラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体

NA座をもつ縁跪で構成された個体を、例えば、コート カラーの判定等により選別することにより得られる。こ のようにして得られた機体は、通常、本発明のタンパク 質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質の ヘテロ発現不全個体間志を交配し、それらの差分から本 発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができ る。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマ イクロインジェクション低でDNA溶液を注入すること によりターゲッティングペクターを染色体内に導入した トランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、 これらのトランスジェニック非ヒト精乳動物に比べて、

遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のある

ものを選択することにより得られる。

【0078】このようにして本発明のDNAがノックア ウトされている個体は、交配により得られた動物組体も 該DNAがノックアウトされていることを確認して通常 の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。さらに、 生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよ い。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を 交配することにより、該不括化DNAを相関染色体の両 方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホ モザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1, ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することに より効率的に得ることができる。ペテロザイゴート動物 の雌雄を支配することにより、該不能化DNAを有する ホモザイゴートおよびヘデロザイゴート動物を繁殖継代 する。本発用のDNAが不能性化された非じト哺乳動物 胚幹細胞は、本差明のDNA発現不全非と下端乳動物を 作出する上で、非常に有用である。また、本発明のDN A発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質によ り誘導され得る種々の生物活性を欠失するため。本発明 のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病の モデルとなり得るので、これらの疾病の原因発明及び治 療法の検討に有用である。

【0076】 (7a) 本発明のDNAの欠損や損傷など に超図する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物 のスクリーニング方法

本発明のDNA発展不全非とト暗乳動物は、本発明のD NAの欠銀や損傷などに起因する疾病、例えば。骨・軟 骨疾患、例えば整形外科領域の疾患(例、背折、変形性 関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨 形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾 思)、歯科領域の疾患(例、口蓋製)、骨粗鬆症などの 疾患に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリー ニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本 発明のDNA発現平全非ヒト哺乳動物に試験化合物を設 与し、談動物の変化を観察・測定することを特徴とす る。本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する実務に 対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のス 群より、全ての総綴が人為的に変異を加えた本発明のD 50 クリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法に

おいて用いられる本義明のDNA発現不全非ヒト哺乳動 物としては、前記と間接のものが挙げられる。試験化合 物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド 性化合物、合成化合物、蒸解生産物、細胞抽出液、植物 抽出級、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら 化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物 であってもよい。具体的には、本発明のDNA発現不全 非とト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照 動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状など の変化を指標として試験化合物の治療・予助効果を試験 10 することができる。試験動物を試験化合物で処理する方 法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いら れ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて 適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量 は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選 探することができる。例えば、GLII遺伝子発現不全 に超図して超こるような軟骨損傷治癒不全に対して治療 ・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、 本発明のDNA発現不全非ヒト確乳動物に骨・軟骨指傷 処職(例えば、骨折など)を行ない、骨・軟骨損傷処職 20 前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の軟骨分 化マーカーの発現量、体重変化などを経時的に測定す る。該スクリーニング方法において、試験動物に試験化 合物を投与した場合、該試験動物の軟骨分化マーカーが 約10%以上、好楽しくは約30%以上、より好楽しく は約50%以上上昇した場合、該試験化合物を軟骨損傷 に対して治療・予防効果を有する化合物として選択する ことができる。

【0077】本発明のスクリーニング方法を用いて得ら れる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物 30 であり、本発明のタンパケ製等の欠損や損傷などによっ て引き起こされる疾患、例えば、骨・軟骨疾患、例えば 整形外科領域の疾患(例、骨折、変形性関節症、骨関節 炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟 骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)、歯科領域の疾 題(例、口養製)、骨粗製能などの疾患に対して治療・ 予防効果を有するので、該療患に対する安全で低毒性な 治療・予防剤などの医薬として使用することができる。 さらに、上記スクリーエングで得られた化合物から誘導 ニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよ く、移化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 「例、無機酸、有機酸)や塩基(例アルカリ金属)など との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付 加塩が昇ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸。臭化水素酸、硫酸) との塩、 あるいは有機酸(例えば、酢酸。ギ酸、プロピオン酸、 フマル酸。マレイン酸、コハク酸、酒石酸。クエン酸。 リンゴ後、藤穂、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼ

ング方法で得られた化合物またはその場を含有する医薬 は、前記した本発明のタンパク質の活性を調節する化台 物を含有する振楽と同様にして製造することができる。 このようにして得られる製剤は、安全で低霧性であるの で、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト』ラット、マウ **ス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、** ネコ、イヌ、サルなど)に対して秩与することができ る。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与 対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、軟 骨損傷の治療目的で該化合物を経口役与する場合、一般 的に成人(体重60kgとして)においては、一日につ き該化合物を約0、1~100mg、好ましくは約1. 0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与 する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与 量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例え ば、軟骨損傷の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常 成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該 化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0. 1~20mg程度。より好ましては約0、1~10mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の 動物の場合も、60kg当たりに機築した量を投与する ことができる。

【0078】 (7b) 本発樹のDNAに対するプロモー ターの活性を促進する化合物をスクリーニング方法 本発明は、本発明のDNA発展不全非とト哺乳動物に、 試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出す ることを特徴とする本発明のDNAに対するプロモータ 一の活性を促進する化合物またはその塩のスクリーニン グ方法を提供する。上記スクリーニング方法において、 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記 した本発明のDNA発現不全非ヒト権乳動物の中でも、 本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することによ り不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNA に対するプロモーターの網獅下で発現しうるものが用い られる。試験化合物としては、前記と同様のものが挙げ られる。レポーター遺伝子としては、前能と開機のもの が用いられ、#-ガラクトシダーゼ選伝子(1ac 2)、可溶性アルカリフォスファターゼ遊伝子またはル シフェラーゼ遺伝子などが好適である。本発明のONA される化合物も同様に用いることができる。該スクリー 40 をレポーター遺伝子で置換された本差明のDNA発現不 全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のD NAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レ ボーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースする ことにより、プロモーターの結構を検出することができ

【0079】例えば、本髪明のタンパク質をコードする DNA領域の一部を大器菌由来のβーガラクトシダーゼ 遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明 のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の ンスルホン酸)との塩などが掛いられる。該スクリーニ 50 代わりにBーガラクトンダーゼが発現する。従って、例

えば、5ープロモー4ークロロー3ーインドリルーβーガラクトピラノンド(X-gal)のようなβーガラクトシダーゼの蒸覆となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで適定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、紊凝または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、βーガラクトンダーゼ反応を停止させ、量色を観察すればよい。また、常法に従い、1acZをコードするmRNAを検出してもよい。

【0080】上記スクリーニング方法を用いて得られる 化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれ た化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター 活性を促進または阻害する化合物である。該スクリーニ ング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、 該化合物の塩としては、生理学的に許客される酸(例、 無機酸)や塩基(例、有機酸)などとの塩が用いられ、 とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。こ の様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リ ン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例 えば、酢酸。ギ酸。ブロビオン酸。フマル酸。マレイン 敵、コハク酸、酒石酸、グエン酸、リンゴ酸、藤酸、安 **島香酸。メタンスルホン酸、ペンゼンスルホン酸)との** 塩などが用いられる。本発明のDNAに対するプロモー ター活性を促進する化合物またはその地は、本発期のタ ンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進す ることができるので、例えば、骨・軟骨疾患。例えば整 30 形外科領域の疾患(例、骨折、変形性関節症、骨関節 表、半月初損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟 骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)、歯科領域の疾 ※(例、口蓋製)、骨粗鬆能などの疾患などに対する安 金で転寄性な治療・予防剤などの医薬として有用であ S 4

mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1回投与量は投与対象、対象痕思などによっても異なる が、例えば、軟骨損傷の治療目的で本発用のDNAに対 するプロモーター活性を促進する化合物を推射額の形で 職常成人(60kgとして)に投与する場合。一日につ き験化合物を約0、01~30mg器度、好ましくは約 0、1~20mg程度、より好ましくは約0、1~10 mg程度を静脈注射により殺与するのが昇都合である。 他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与 することができる。このように、本発明のDNA発展不 全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモー ターの活性を促進する化合物またはその塩をスクリーニ ングする上で纏めて有用であり、本豪明のDNA発現不 全に超因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の 開発に大きく質徴することができる。また、本発明のタ ンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使っ て、その下流に穏々のタンパクをコードする遺伝子を連 結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランス ジェニック動物(遺伝子移入動物)を作成すれば、特異 的にそのタンパクを合成させ、その生体での作用を検討 することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に 適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するよ うな細胞株を樹立すれば、本発明のクンパク質そのも のの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する 作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。ま た該プロモーター部分を解析することにより新たなシス エレメントやそれに結合する毎年因子を見つけることも 可能である。

【0082】本明部番および照面において、塩基やアミノ機等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Permanisture による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に例示しなければし体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

e DNA と相補的デオキシリボ技術

A : アデニン
T : チミン
G : グアニン
C : シトシン
RNA : リボ綾鯵

mRNA メッセンジャーリポ核酸

Gly : グリシン Ala : アラニン Val : パリン Lau : ロイシン Ile : イクロイシン

Ser :セリン 30 Thr : スレオニン

 Cys
 : システイン

 Met
 :メチオニン

 Glu
 :グルタミン酸

 Asp
 : アスパラギン酸

Lys :リジン

Ars : アルギニン His : アルギニン

Phe ;フェニルアラニン

Tyr : チャシン

Trp : トリプトファン

Pro : 7097

Ass ; アスパラギン

G La :グルタミン

p (5 1 n : ピログルタミン酸

【9 0 8 3】本額明総書の配列表の配列番号は、以下の 配列を示す。

「配列番号:1] G111 mRNAの量を額定する際 に使用できるPCR用プライマーを示す。(実施例4お よび5)

「極残番号: 2] Glil mRNAの最を測定する群 20 に使用できるPCR用プライマーを示す。 (実施例4お よび5)

「魔列番号:3]マウスG1+1 cDNAの取得のために使用したプライマーを示す。

「変列番号: 4] マウスG 1 i 1 c DN Aの取得のために使用したプライマーを示す。

[監列番号:5] 実施例1、2および4のRTーPCRで使用したプライマーを示す。

【配列番号:6】実施例1。2および4のRTーPCRで使用したプライマーをデす。

〔配列番号:7〕実施例3のRTーPCRで使用したプライマーを示す。

「配列番号:8]実施例3のRT-PCRで使用したプライマーを示す。

〔配列番号:9〕マウスG 1 i 1 適伝子(c.DNA)の 塩基配列を示す。

〔極頻数号:10〕マウスG 1 1 1 クン//ク質のアミノ 酸配列を示す。

〔配列番号: 1 1〕 にトG1i1タンパク質のアミノ酸 配列を示す。

- [程列番号:1-2] ヒトG + 1 1連伝子(c DNA)の 塩基配列を示す。

〔紀列番号:13〕ヒトG111変異タンパク賞1のア ミノ機配列を示す。

「配列番号:14] ヒトGlil変異選伝子1(EDNA)の塩基配列を示す。

【配列番号: 15] ヒトG 1 i 1変異タンパク質 2のア ミノ酸配列を示す。

「配列番号:16] とトG1 | 1変異遺伝子2 (e DNA) の塩基配列を示す。

[配列番号:17] ヒトGlil変異タンパク観3のア ミノ酸配列を示す。

「配列番号:18] ヒトG!|||変異遺伝子3 (eDNA) の塩基配列を示す。

「配列番号:19] マウスG1i3タンパク質のアミノ 酸配列を示す。

[配列番号: 20] マウスG113遺伝子(cDNA) の塩基配列を示す。

[配列番号:21] ヒトG 1 1 3タンパク質のアミノ酸 10 配列を示す。

「配列番号: 22] ヒトG 1 i 3歳伝子 (c DNA) の 塩基配列を示す。

# [0084]

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に設 例するが、本発明はそれらに限定されるものではない。 なお、大腸菌を用いての遺伝子操作は、モレキュラー・ クローニング(Wolecular Cioning)に記載されている 方法に従い、各種キット類の使用法は添付されているマニュアルに従った。

【0085】まず実施例に用いたG1:1およびSci eraxis発現ベクターの作製方法、締約絡後条件、 遺伝子導入法を以下に示す。

[Gli1発現ペクターの講製] マウス19日胎児ライ ブラリーより配剤参考: 3および4にポオプライマーを 使用し、PfuTurbo(Stratageae)DNA polymerase を用い てPCR独にてマウスGlii cDNAを得た。得ら れた断片はp C R b l u p ι (Invitrogen) ベクターに クローニング後、塩基配列を設定した。その結果、暮ら れた遺伝子は公知のマウス遺伝子であるAF02830 5とはアミノ酸レベルで24個、またAB025922 とは同じく2個の異なる配列を有していた〔DNA配 列:配列番号:9 (マウスG1 | 1遺伝子の塩基配列は 具体的には配列番号:9の第213番目のAから第35 4.5番目のCまでの塩蒸配列)。タンパク質のアミノ酸 |観測:配列番号:10および図1]。次にこのベクター をNotl, Hindlllで消化し、pcDNA3. 1 (Levitrogen) にGlil版片をサブクローニングす ることによって動物細胞発展ペクターを翻製した。

【Scleraxis発現ペクターの翻製】Scleraxis付針・軟管分化に関与することが報告されているが(Liu,Y. et al. J. Biol. Chem. (1997) 272, 2988 0-29885)、その機能の詳細は不明なところが多い転写図子である。マウスライブラリーよりPCR法にてマウスScleraxis cDNAを得た。得られた断片はpCRblunt(Invitrogen)ベクターにクローニング後、BamHI-Xholで消化し、pcDNA3.1(Invitrogen)にScleraxis断片をサブクローニングすることによって動物細胞発現ペクターを翻製した。

50 (細胞培養法) マウス繊維芽細胞株C3H1GT:/2

様、およびマウス筋芽細胞種C2C12はATCCより 購入し、10% FBSを含むDMEM (GIBCO) にて結奏した。ヒト正常軟骨細胞は東洋動より購入した ト正常軟骨細胞培養キットに含まれるChandrocytes gro wth mediusを用い、細胞培養ディッシュ(Falco n)で培養した。なお、この細胞はディッシュで培養し ているため服分化しており、軟骨細胞マーカーであるI 「型Bコラーゲン遺伝子は発現しなくなっている。

(遺伝子導入法) ウェルあたり約15万億の細胞を24 ウェルブレートに揺さ、翌日上記発現パクターとFugene 10 8 (ペーリンガー) を説和し、各種細胞に添加すること によってトランスフェクションした。

【化合物添加法】ウェルあたり約20万個の細胞を24 ウェルブレートに響き、2時間後、ジメチルスルフォキ ンド (DMSO) に溶解した9-(2-letrahydrofury1)ade nine (THFA) を添加した。最終DMSO濃度は0. 1% (マノマ) 以下とした。

「発現量比較」トランスフェクション、あるいは化合物 能加後2日日にRNeasy mini kit (Qiagen) を用いてR NAを抽出し、message clean kit (genhanter) でDN 20 m s n 処理した後、RNA PCR kit (Takara) に従いRT ーPCRを行った。反応後、アガロースゲルにて電気体 動し、Gal image (Genomic solutions) を用いて目的の パンドの比較を行った。

【0086】実施例1 G L i 1 発現ペクター導入によるマウスで3 H i 0 T 1 / 2 譲跑の軟骨分化に及ぼす影響

Glil美様ベクターまたはpcDNA3. IをC3H 10T1/2細胞排にトランスフェクション後,2日間 に便列番号:5および8にポオプライマーを用いてRT ーPCRを行ったところ数骨分化のマーカーである11 型Bコラーケン遺伝子(Col2sl)の発現が、ベク ターpcDNA3. 1 (Invitrogen)を導入した場合を 1とするとGlilを導入すると3. Dを示した。ま た、この時間時にSonic hedgehog, Indian hedgehogお よびScleraxisの発現を見たが、全く発現を認 めなかった。

【0087】 実施術2 Glil 基環ベクター導入によるマウスC2C12細胞の軟骨分化に及ぼす影響 Glil 発現ベクターまたはpcDNA3、1をC2C 40 12細胞株にトランスフェクション後2日目に配列番号:5および6に示すプライマーを用いてRTーPCRを行ったところ、この細胞はベクターpcDNA3、1を導入した場合Cpl2s1を全く発現していなかったのに対し、Glil 遺伝子を導入することによってColl2s1の発現を認めた。

【0088】実施例3 G111発現ベクター導入による総分化型に上正常軟骨細胞の再分化に及ぼす影響 G111発度ベクターまたはpcDNA3.1を設分化 間に上正常整理部別によるスプラーなど、2011に 配列番号:7および8に示すプライマーを用いてRTー PCRを行ったところ、この細胞はベクターpcDNA 3、1を導入した場合COL2A1を全く発現していな かったのに対し、Glil激伝子を導入することによっ てCOL2A1の発現を認めた。

【0089】実施例4 マウスC3H10T1/2細胞の教育分化に及ぼすScleraxis選伝子の発現による教育分化に及ぼす効果

マウスC3H10T1/2細胞の軟骨分化に及ぼすGL i 1以外の転写因子の発現による軟骨分化に及ぼす効果 を見るために、Scleraxis歳伝子をトランスフ エクションした。トランスフェクジョン2日目に配列番 号:5および8に示すプライマーを用いてRTーPCR を行ったところ軟骨分化のマーカーである11型8コラ ーゲン遺伝子(Collast)の発展が、ベクターもた DNA3、1を導入した場合の約2倍向上していた。こ の時間様にScleraxls遺伝子発現によるGli 1 激伝子の発現を配列番号:1 および2に示すプライマ 一を用いて見たところpcDNA3. 1を導入した場合 の約2.5億向上していることがわかった。このことは Scleraxisの軟骨分化に対する効果はGlil の発現上昇に起因することを示唆しているが、Sonio he dgehogおよびIndian bedgehogはこの条件ではいずれも 発展しておらず、Scletaxisはヘッジホックを 介きずにGlilを誘導しうることがわかった。即ちへ ッジホッグタンパク質を用いなくともG 1 1 1 を介した 軟骨分化を誘導しうることが明らかとなった。

【0090】実施例6 Glil発現を誘導する低分子 化合物の探索

C3H10T1/2細胞を用いてGli1発現を誘導す る低分子化合物を操築した。その結果、9-(2-Telrahydr ofuryl)adeniam (THFA) を500μMで級加すると2 日後にはOli1運伝子の発現はDMSO添加時に比べ 約2. 3倍向上していることが配列番号:1および2に 示すプライマーを使用したRTーPCRにてわかった。 この時じゅ12 a 1の発現も約2、3倍向上していた。 この場合もSclaraxisそSonic hedgehog, Indi an hedgehogの発現は認められず、THFAの軟管分化 誘導効果はヘッジホッグタンパクを介さずにGLi1を 誘導することに起因していることがわかった。以上の結 果より、GIi1の発現の増減を指標として選択される 化合物は骨・軟骨疾患予防、治療薬として有望であるこ とが判別した。また上記の実験はマウスの遺伝子を用い て実施されたが、ヒトの遺伝子とマウスの遺伝子には非 常に高い相関性があることは既知であり。と下の遺伝子 を用いてもこれらの結果と同様の結果が得られることは 容易に予測できる。

#### [0091]

Gli1業様ベクターまたはpcDNA3、1を脱分化 【発明の効果】Gli1進伝子またはその産物は骨ある型とト正常軟骨線胞にトランスフェクション後2日目に 50 いは軟骨分化誘導活性をするため、整形外科領域の疾患

(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の 軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨、軟骨欠損師の 再生、脊椎間定衛、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成 不全建、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患しまた は、黄料領域の疾患(例、口蓋製、下物骨再建循、備槽 堤形成策などの骨再建)、さらには骨粗鬆症などの予防 ・治療剤として用いることができる。また、美容外科額 域における骨移植の治療剤としても用いることができる し、再生医療における自家稼働の際の分化誘導剤として も利用できる。また、G 1 i 1 タンパク領等を用いたス 10 -クリーニング方法。GIII強伝子を発現する能力を有 する細胞を用いたスクリーニング方法またはレポーター 遺伝子発現形質鉱操体を用いたスクリーニング方法は、 G111歳伝子の発限を制御(促進または阻害) する活 統を有する化合物、Glil遺伝子のプロモーターもし くはエンハンサーの活性を制御(促進または阻害)する 作用を有する化合物、骨・軟骨分化調節(促進または粗 (者) 作用を有する化合物、またはそれらの塩の探索に用 いることができる。このような化合物を用いてGli1 遺伝子またはその産物の作用(例、転写活性)を増強まる30

\* たは活性化することによって管・軟骨分化を誘導するこ とができる。上記スクリーニングにより得られうるGI i 1 遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物などは 骨、あるいは軟骨誘導活性を有するため、整形外科領域 の疾患(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板樹 傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨、軟骨欠 損部の再生、脊椎器定術、脊柱管拡大衡などの骨再建。 骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾 集)または、歯科領域の疾患(例、口蒸製、下顎骨再建 術、歯槽環形成術などの骨再建)、さらには骨粗鬆症な どの予防・治療剤として用いることができる。また、美 容外科領域における骨移植の治療剤としても用いること ができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導 **薄としても利用できる。一方、上記スクリーニングによ** り得られうるGIII適伝子の発現を阻害する活性を有 する化合物やGILI撤伝子のアンチセンスDNAなど は、例えば管・軟骨形成温剰能の予防・治療剤として用 いることができる。

[0092]

[配列表]

SEQUENCE LISTING

```
(119) Takeda Chemical Industries, Ltd.
```

(120) Use of Glil gene

<1302 P2001~179

(140)

(141)

<150> JP 2000-242767

<151> 2000-8-4

(160) 22

(170) Patentin Ver. 2.1

<2105-1

<2115 22

<212> 084

<213> Artificial Sequence

< 2290

(223) Designed alignmucleatide primer to amplify DNA encoding Glil

<409> 1

AGACTECCEC TEGGATEGETT EC

22

₹210> -2

**KZ11D 22** 

<212> DNA

(213) Artificial Segmence

(220)

(223) Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding Glit

<400> 2

TODOCTOGAT GOOGCTIGGT CA

22

₹210> 3

<211> 24

<23.2> DNA

```
(213) Artificial Seguence
```

(220)

<223> Designed oligonuclectide primer to amplify DNA encoding Clil

(400) 3

TTEACGTTGG GATGAAGAAG CAGT

24

⟨210⟩ 4

(211) 23

(212) DNA

<213) Artificial Sequence

(220)

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DEA encoding SIII

64990 A

AATACAGCEC OCAGCOCAAA CCT

23

<210> 5

(211) 21

KEREZ DNA

<213> Artificial Sequence

(220)

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding memore Col2-

83

<400) S

GCTCATCSCC GOSGTCCTAC G

23

<230> 6

<2335 22

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Designed ofigonamicatide primer to amplify DNA emmoding mouse Col2

aì

<400> €

CECGCCAGGE ECGCCAGGAT TG

22

<2102.7

(211) 22

<212> DNA

(213) Artificial Sequence

₹220>

<223> Designed oligonuclectide primer to amplify DNA encoding busen Col2

аĨ

(400) 7

CCCCGGCACT CCTGGCACTG AT

22

⟨210⟩ 8

(211) 24

(212) INA

<213> Artificial Sequence

<\$500

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human Col2

at

<499> 8

CTTOGGCACC TOGGGCTCCT TTAG

24

₹2105 9

2820

2580

2640

27(8)

2760

(34) 65 68 **K211> 3835** <212> DNA <213> Mouse (400) 9 TTGAGGTTGG GATGAGAAG CAGTTGGGAC GGCCAGCTGG AQGTCTGCGT GGTAGAGGCA 60 ACTOCAGAGA CTGTGGATGE COARGACTGA ACGGCTGGTT CTGCCCACTC TTTGGGATGT 120 TICTICTIAA GGAAGEIGAA AAREGITATI GATTICCAIG ACCAGTITICI GAGAIGAGGG 139 TRAGAGNICO OCTOATOCTI COUTGAGACH CUATGITCAA TOCAATGACI COGCOACAAG TCANTAGCTA TOGTGAGCCA TOCTGTCTCC GACCCCTCCA CAGCCAAGGA GTCCCCAGCA 300 TESSAACASA ASSACTITET SCIETESCECT TITESCEACCA ASCCAACTIT AFGREAGGST 360 COCARDOTTA TOGACICAGOO AGAGAGACCA GLAGOTOCAC TGARGGATOT CTOTTTOCTO 420 CTECTOCTEC TECTOSCAST TENGTURANT TANCARAGAN OCCUSECTORS TECCHTOCOC 480 CONTITICIGA TOCCASCOTO GACCIGOAGA COSTAGIOCO GACCIDÁCOS ASCITOCOTOS 549 TOGETTICAT CAACTETEGE TOTALATETE COOKEGETTE CTACGGECAT CICTOCATTG 600 GENCCATGAG CUCTTUTTIA GGATTUUCAC CTUAGATGAG TUATCAAAAA GGAACTICAC 660 CHECCHATES ACTOCACCOC TENETTOCAC ATGACTICTAD TOCSCOTTICA ATGATECTIC 720 ACCCCCAGGC CCGGGGACCA CGTGCAACCT GCCAGCTGAA GTCAGAGCTG GATATGATOG 780 TIGGCASGIG COOGGAGGNO COTTIGGASG GEGACATOTO INCOCOCCANO TODACAGECA 840 CACAGGATCA COTGTTGGGG ATGCTGGATG GGCGGGAGAA COTGGAGAGA GAGGAGAAGC 900 CTGASCETGA STCTGTGTAT GAGACAGAET GERBCTGGGA TSCTTGCASE CAGGACTTCG 980 ATTOCCAGGA GCAGOTGGGG CACCACATUA ACAGTGAGGA TATOCAGGGG GAGGGGAAGG 1020 ANTICOTOTO CCATTOGOGA SCATOCICCA GUGAGCIGAG GCCCTICANG SCCCANTACA 1680 TECTOSTEST CONCATGOOD AGRICACACES GOURGRAGED ACACAAGTEC ACCTTTGAAG 1140 OCTOTOGGAS GTOCKATICA COCCITOSAS SOCIOSAGEO OCECCITORO TODOSECAÇOS 1200 STEAGAAGEE TTACATOTET GAGCAAGAAG STTGCAGCAA GGCCTYTAGC AATGCCAGTE 1260 ACCOCGECAN OCACCAGANT COGACCCACT CCANTGAGAN GECATACUTG TOCANOCTEC 1320 CONSCIPERC CARGONITAC ACAGANCECA OCTOSCICIO CARACACOTO, ARGACAGNOC -1389ATORTICEGGA TOCCCAROTG ACCAMOUGE ATOGAGEDA TORCCOUTTG COACHOGETC 3.440 AUCOCCTCTC CACACTGGAG CCCAAGCGGG AAAGGGAAGG AUGATCCGGC AGGGAAGAGA 1500

GCAGACTGAC TETERCOGAG AGTOCCATOC COCAGCAGAG CUCCOGAGCG CAGTCCTCTT 1860 CONSCIDENT CONCIOCION GONDOCAGTO OVOCCANONO GENCAGOSGO GTRONGATOS 1620 CCOGCAACGE CGGGGGCAGE ACTGAGGACT TUTCCAGCTT GGATGAAGGA CUTTGTGTCT 1680 CBSCCACCGG ACTUTOCAGG CTTCSCCBCC TGGAGAACCT TAGGUTGGAT CARCTGCATC 1740 ASCICUOSCO CATAGOSTOT CHESSIOTES AACIGOUCAS CITAACCOAC SCISGOSCAC 18683 CIEFUTCICE CONTUIERE COUCCARTEL CHETRIANE LOCCARGARE MECICORRA 1860 GCATGAGCTC TECTTACACA CHUAGCCECA GETOCTCCCT GSCATCOCCT TTCCCGCCSC 1920 GRACOCCACO AGAGAATGOG ECATOGTOAC TACOTOGOCT CACACOTOCT CAGCACTACA 1980 TECTOCOTEC CHEATATECT TORECTAGES COASTOCCHO COOCCOACT SCASCICACA 2040 SCCTGGATEG GATGGGAGGT CTTTCTGTTC CTCCTTGGAG AAGCCGAACC GAGTACCCGG 2100 GATACANCUC ANATGUNGGG GTUNCTUGGN GGGCUNGTGN CCUNGCUGGG GUTNUTGNCU ACCUAGETEC ACCUAGACTO CAGORGETOLA AGACCOTROS ATGTGTOCAC ACGORCOCETA 2220 GTOTOGERAC ADGACEGAAC TICGATOCOC ACCACOCTAC CICTOTOTAT TOGOCACAGO 2289 CUDICAGCAT CACCUAMANT STIGURATES ATACTAGEOG GETACAGGAG GAGERAGAGG 2340 TTGGAACTIC CGTGATGGGC MATGGTCTGA ACCCATACAT GGATTTTTCC TCCACTGATA 2460

CHOTGGGATA TEGGGGGGCCC GAGGGGACGE CAGCTGAGCC TYATGAAGCT ACCOGTCCAG

CHICCOTOCC TOTTOGGOOD GOTCCACCAA CCAACTATOG COCTOGCCAC TOTGCOCAGE

AGGTCTCCTA TCCTGATGUC ACCUCAGASA ACTGGGGTGA GTTCCCTTCT CATGCTGGGG

TOTACOCTAG CANTAAGGET CONGETSETG CETATAGCCA CTGTCCTCWA CTTGAGCATT

ATGCACAGOT GCAGETÁAAS CCAGÁACAAG GETOCUCAGT GOGETCTGAC TCCACCEGAT

TERCALLECTIC CUTCHATICCE CALCULARTS ANDIGITICAL AGGLECIALAS CUTCHOTTIT

2880

2940

3000

3066

3120

3180

3300

3360

3420

3480

3540

3600

3635

225

230

238

Arg	Trp	Asp	Gl.y	Cys 245	Sex	Gln	(In	Phe	Asp 250		Gin	Glo	. Gln	Leu 255	
Užs	-His	De	Asn 260	Ser	Glu	Hís	He	His 265	Gly		Arg	Lye	01u 270	Phe	
Cys	His	Trp 275	Gly		Сув	Ser	ārs 280	Glu		Arg	Pro	Phe 285	Lys		Gln
Ty1	Het 290	Les		Va1	His	Met 295	årg		His	Hir	Gly 200	Glu		Pro	His
Lys 305	Cys		Phe	Glu	Gly 310			Lys		Tyr 315	Sex		Leu	Glu	-Asu 320
		The	His	Leo 325	Arg	Ser	His	Thr		Glu		Pro	Tyr	Met 325	
Glu	Gin	Glu	Gly 340	Cys	Ser	Lys	Ala	Phe 348	Sur		Åla	Ser	Asp 350		Ala
Lys	Ržs	61.n 358	Åsti		Thr	His	Ser 360	Asn		Lys	Pro	Tyr 365		Cys	Lys
Leu	Pro 370			Thr	Lys	Arg 378	Tyr	Tur	Asp	Pro	Ser 380	Ser	Leu	årg	Lys
His 388		Lys	Thx	Val	Hi.s 390	Oly	Pro	ásp	Ala	His 395		Thr	Lys	årg	His 400
Ārg	Gly	Азр	Gly	Pro 405	Leu	Pro	Arg	Ala	61n 410	Pro	Leu	Ser		Val	Glu
Pro	Lyg		Glu 420	Arg	Elu	Gly	Gly	Ser 425		Arg	Glu	Glu	5er 430	Årg	Leu
Thr	Val	Pro 435	Glu	Ser	Ala	Het	Pro 440	Gla	Gin	Ser	Pro	01 y 445	Ala	Gla	Ser
Ser	Cys 456	Ser	Ser	Asp	Bis.	Sex 455	Pro	Ala	Gly	Ser	Ala 460	Ala	åsp.	Thr	Asp.
Sex 465	Gly	Yal	Glu	Met	Ala 470	Gly	Aen	Ala	Gly	Gly 475	Ser	Thx	Glu	Asp	Leu 480
Ser	Ser	Leu	Asp	Giu 485	Gly	Pro	Cys	Val	Ser 490	Alu	Thr	Gly	Leu	Ser 495	Thr
Leu	Arg	Årg	Leo S00	Gla	Asm	Leu	Årg	Leu 305	Asp	Gln	Lep	His	Gla 510	Leu	årg
Pro	He	61y 615	Şer	Arg	Gly	Leu	Uys 520	Leu	Pro	Ser	Leu	Thr 925	His	Ala	Gly
Ala	Pro 530	Yal.	Ser	Arg	Arg	Leu 535	Gl.ÿ	Pro	Pro	Val.	Sex 540	Lau	Asp	Årg	Årg:
545					Ser 550					550					860.
				565	Pro				570					675	
			580		Gly			585					590		
		595			Ala		600					605			
His	30r 610	Leu	åsp	Arg	Met	618 618	Gly	Leu	Sex	Val	Pro 620	Pro	Tip	Arg	Ser
Arg 825	Thr	Glu	Tyr	Pro	61y 630	Tyr	Asn	Pro	Asn	Ala 635	Gly	Val	Thr	Arg	Arg 640

Ala	Ser	Åsp	Pro	Ala 545	Arg	Ala	Ala	Asp	His 680		Ala	Pro	Ala	Árg 655	
Gla	Arg	Phe	Lys. 860	Ser	Leu	Gly	Cys	Val	His		Pro	Pro	Sex		
Thr	Gly	Arg 678	Asa		Åsp	Pro	His 689	llis		Thr	Sex	Va1 685		Ser	Pre
Gln	Pro 690			He	The	61n 698	Asa		Ala	Set	дар. 766		Arg	Gly	Leu
Gla 705		Glu	Pro	6lu	Val 710			Ser	Vai	Met 715		Asn	Gly	Leu	Asn 720
Pxo	Tyr	Met	Аяр	Phe 725	Ser	Sex	Thr	Anp	Thr 730		Gly	Tyr	Gly	Gly 785	Pro
Slu	Gly	Thr	Åle 740	Ala	Glu	Pro	Tyr	Glu 745	Åla	Arg	Gly	Pro	61y 759	Ser	Leu
Pro	Leu	Gly 755		Gly	Pro	Pro	Thr 760		Tyr	Gly	Pro	61.y 768	His	Cys	Ala
Gla	Sin 770	Val	Ser	fyr	Pro	Asp 778	Pro	Thr.	Pro	Glu	Àsn 780	Trp	Gly	Glu	Phe
Pro 785	Ser	His	Ala	Gly	'Val 790	Tyr		Ser	Asn	Lув 795	Als	Pro	61y	Ala	Ala 800
ĵyr	Ser	Gln	Cys	Pro 865	Arg	Leu	Glu	Ms	Tyr 810		Gla	Yal	Gln	Val. 815	Lys
Peo	Olu	Gln	Gly 820	Сув	Pro	Yel	Gly	Sex 826	App	Ser	Thr	Gly	Leu 880	Åla	Pro
Cys	Leu	Asn 839	Ala	16.5	Pro	Sex	Glu 840	Gly	Ser	Pro	Gly	Pro 845	Gin	Pro	Len
Pie	Šer  880	Hie	His	Pro.	Gin	Les 889	Pre	Ğ) n	Pro	Gln	Tyr 860	Pro	GIn.	Ser	(i) y
Pro 865	Tyr	Pro	Gln	Pro	Pro 870	His	Gly	Tyr	Leu	Sex 879	Thr	610	Pro		Leu 880
Gly	Lea	åss	Pho	Asn 885	Pro	Ser	Sex	Ser	His 890	Ser	Bur	Gly	Gln	Leu 895	Lys
			960					905					910.		Trp
Glu	Gly	årg 915	Åsn	Arg	(Hy	Gly	Leg 920	Pro	Åsn	Gln.	Gha	Len 925	Pro	Tyr	(In
	930				63 v	935					940				
Thr 945	Pro	Ma	Als	Ala	Ala 950	ála	Ala	Tyx	Gly	Ser 983	6] y	Phe	Ala	Pro	Ala 960
Sex	Ala	Asti	His	Lys 966	Sex	Gly	Ser	Tyr	Pro 970	Ala	Pro	Ser	Pro.	Cys 975	His
Glu	Thr.	Phe	Thx 980	¥a į	Gly	Yal	Ásti	Ars 995	Pro	Ser	8is	Arg	Pro. 996	Ala	Åla
Fro	Pro	årg 995	Leu	Leu	Fre	Px30	Leu 1000		Pro	Çys	Tyr	Gl y 1008		Léa	Lys
Val.	Gly 1010		Thr	Åsa	Pro	Ser 1016		G).y	His	fro	Glu 1020		Gly:	àrg	Lau
Sty	Ala	6ly	Pro.	Ala	Leu	Tyr.	Pro	Pro	Pro			Gin	¥a (	Cys	
1026					1000	3				1035					1040

```
77.4
```

```
73
Ala Leu Asp Ser Leu Asp Leu Asp Asm Thr Gln Leu Asp Phe Val Ala
             1045
                      1.050
He Lou Asp Gla Ala Gla Gly Lou Ser Pro Pro Leu Ser His Gla Gla
                            1065
Gly Asp Ser Ser Lys Ash Thr Pre Ser Pro Ser Gly Pro Pro Ash Met
                1080
Als Val Gly Asm Not Ser Val Lou Lou Gly Ser Lou Pro Gly Glu Thr
              1095
                                        1100
Oin Phe Leu Asn Ser Ser Ala
1105
                  1110
(210) 11
<2115 1106
<212> PRT
(213) Hussan
(400) 11
Met Phe Asn Sex Met Thr Pro Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro
                      10
 1 ...5
Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Clu Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr
                              25
Glu Gly Leu Ser Gly Pro Pro Phe Cys His Gle Ala Asa Leu Wet Ser
                         40
Gly Pro His Ser Tyr Gly Pro Ala Arg Glu Thr Asa Ser Cys Thr Glu
                     99
Gly Pro Leu Phe Ser Ser Pro Arg Ser Ala Val Lys Leu The Lys Lyc
                          75
         70
Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu Asp Leu Glo
                                 90
Thr Val IIe Arg Thr Ser Pro Ser Ser Lea Val Ala Pae IIe Asa Ser
                           195
          100
Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly His Leu Ser Lie Gly Thr
                        120
Net Ser Pro Ser Lew 617 Phe Pro Ala 61a Net Asm His 61a Lys 617
           135
                               140
Pro Ser Pro Ser Pae Gly Val Gla Pro Cyn Gly Pro His Asp Ser Ale
Arg Gly Gly Met Ile Pro Bis Pro Gla Ser Arg Gly Pro Phe Pro Thr
              168
                                170
Cys Gla Leu Lys Ser Siu Leu Asp Met Leu Val Gly Lys Cys Arg Glu
          180
                            185
Gin Fro Lea Glu Gly Asp Met Ser Ser Pro Ash Ser Thr Gly He Gin
                        200
Asp Pro Leu Leu Gly Met Leu Asp Gly Arg Glu Asp Leu Glu Arg Glu
                    215
Giù Lys Arg Giu Pro Giu Ser Vai Tyr Glu Thr Asp Cys Arg Trp Asp
                230
235
                                    235
Gly Cys Ser Gla Glu Pae Asp Ser Gla Glu Gla Leu Val His His Ile
                      250
              248
Asa Ser Glu His The His Gly Glu Arg Lys Glu Phe Val Cys His Trp
           288
                             265
```

75.

Cly	61y	Cys 278	Ser	Átg	Glu	Leu	Arg 280		Phe	Lys	Ala	61a 285	Tyr	Met	Les
Val	Yal 290		Me t	årg	Arg	His 295		Gly	Glu	Lys	Pro 300	His	Lys	Cys	Thr
Plin 309		Gly	Cys	Arg	i.ys 310		Tyr	Ser	Arg	Leu 315	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr 320
His	Leu	Arg	Sex	His 325	Ther		Glu	Lys	Pro 330	Tyr	Met	Cys	Glu	His 335	
Gly	Cys	Ser	Lyc 340		Phe	Ser	Asn	Ala 345	Ser	Asp	Arg	Ala	Lys 350	His	Gla
Ash	Årg	Tha: 355	His	Sex	Asm	G)n	Lys 360	Pro	Tyr	Val	Cys	Lys 365	Lou	Pro	-Oly
Сув	Thr 370	Lys	Arg	Tyr	Thr	Åsp 375	Pro	Ser	Ser	Leti	Arg 380	Lys	His	Val	Lys
Thx 385		His	Gly	Pro	Asp 390	Ala	His	Val		Lys 395	ång	Ris	Arg	Gly	Asp 400
61 y	Pro	Leu	Pro	Arg 405	Ala	Pro	Ser	lle	Sex 410	The	Vai	(1) 8	Pro	Lys 415	
Glu	årg	Glu	Gly 420	Gly	Pro	He	årg	61 u 428	Glo	Ser	Arg	Leu	Thr 430	V2]	Fre
Glu	Gly	Ala 488	Met	Lya	Pro	Gln	Pro	Ser	Pro	Gly.	Ala	GIn 445	Sex	Sex	Сув
Sex	Ser 450	Asp	Bls	Sec	Pgo	Ala 488	Gly	Ser	Ala	als	Asn 460	Tion	Aso	Ser	-61 y
Val 465		Bet.	Thr		Asn 470		Gly	Gly	Ser	Thr 475		Asp	Leu	Ser	Ser 480
	Asp	<b>61</b> 8	Gly		Cys	Π¢	Ala	Gly	Thr 490		Lou	Sex	Thr	Len 495	
Arg.	Leu	0lu	Åsn 500	Leu	Arg	Leu	Asp	Gln 505	Lea	His	Gla	Leu	Arg 510	Pro	lle
Gly'	Thr	Årg 515	Gly	Leu	Ļуз		Pro 520	Ser	Leu	Sex		Ther 525	Gly	Thr	Br
Val	Ser 230	Arg	årg	Val	G).y	Pro. 535	Pro	Va)	Ser	Len	61u 540	Arg	Arg	Sec	Sex
Sex 545	Ser	Ser	Ser		Ser 550	Sex	Ala	Tyr	Thr	Val 885	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser 560
	Ala	Ser	Pro		Pro	Pro	Gly	Ser	Pro 570		Glu	Asn		Ala 575	Ser
Ser	Leu	Pro	61y 580		Net	Pro	Als	Gln 585		Tyr	Leu	Leu			Arg
Tyr	Ala	Sex 595	Ala	Arg	Gly	Gly	61y 600		Ser	Pro		Ala 605		Sex	Sex
beti	Asp 510		ile	Gly	Gly	Leu 615	Pro	Met	Pro	Pro	Trp 620	Arg	Ser	Arg	Ala
61u 628		Pro	Gly		Aen 630		Asn	Ala	Gly	Val		Arg	Arg		Ser 640
	Pro	Ala			Ala	Asp	Árg		Ala 650		Åla	Arg	Val		

		11													
Phe	Lys	Sex	Leu 660		Cys	Val	His	Thr 665		Pro	Thr	Val	Ala 670		Gly
01 y	Gin	830 675	Phe	Asp	Pro	Tyr	Leu 680		Thr	Ser	Va]	Tyr 685	Ser	Pro	Ön
Pro	Pro 690		He	Thr		Ann 899		Ala	Met	åsp	Ala 700		Gly	Lea	Gla
G) ii			GBu	Val				Set.	Va L	Gly			Let	Ásn	Pro
708					710					718					720
Tyr	Wet	Asp	Phe	Pro 725		Thr	åsp	Thr	Leu 730		Tyr	Gly	Gly	Pro 735	Gl <sub>ii</sub> i
Gly	Ala	Ala	Ala 740		Pro	Tyr	Gly	Ala 745		Gly	Pro	(dy	Ser 750		Pro.
Lep	Gly	Pro 755	Gly	Pro	. Pro	The	Asn 760		Gly	Pro	Asn	Pro 768	Cys	Pro	Hn
Gla	Ala 770		Tyr	Pro		Pro 775	Thr	Gln	Gla.	Thr	Trp 780	Cly	Glu	Phe	Pro
Ser	His	Ser	(G) y	Leu	Tyr	$b^{1,0}$	Gly	Pro	Lys	Åla	Lew	Sly	Siy	Thr	Tyr
785					790					795					800
Ser	Gla	Cys	Pro	Arg 803	Les.	@lu	His	Tyr	61y 810	Glp	Val	Th i	¥ <u>a</u> ]	Lys 815	Pro
Glu	Gin	Gly	Cys 820	Pro	Val.	Gly	Sex	Asp 825		Thr		Leu	Ala: 830	Pro	Cys
Leu	åsb	Ala 835	His	Pro'	Ser	6In	61y 840	Pro	Pro	His	Pro	61n 845	Pro	Leu	Phe
Sex	His 850	Tyr	Pto	Gla	Pro		Pro		Gln	Îyr	Leu 860	Gln	Ser	Gly	Pro
Tyr 885	Thr	Gla	Pro		Pro 870	Åsp	Tyr	Leu	Pro	Ser 875	Gla	Pro	Ārg	Pro	Cys 880
Leu	Asp	Phy	Asp	Ser 885	Pro	Thx	His	Ser	Thr 890	Ġly	Gln	Leu	Lys	Ala 898	Gla
Evers	Val	Сує	Asn 900	Тух	Vail	Gla	Ser	61a 908	Gla	Glu	læi	teo	Trp 910	G) g	Gly
Gly	Gly	Arg 915	Glu	Asp	Ala		Ala 920	Gla	Glu	Pro	Ser	Tyr 925	G}n	Sex	Pro
lys	Phe 980	Leu	Gly	Gly	Ser	ÇIn 936	Val	Sex	Pro	Ser	árs 940	Ala	Ļys	Ala	Pro.
Va I 946	Азв	Her	Tyr	Gly	Pro 950	Gly	Phie	Gly	Pro	Asa 955	Leu	Pro	Ass	Sis	Lys: 960
Seri	Gly	Ser	Tyr	Pro 965	Thr	Pro	Ser	Pro	Cys 970	llis	Glu	Astr	Phe	Va) 975	Vs)
Gly	Ala	Ásm	Arg 980		Ser	His		Ala 985		Ala	Fro		Arg 990		Leu
Pro	Pro	Leu 998		Thr	Cys				Leu	Lys				Thr .	Ass
Pro	Ser	Cys	Gly	His	Pro			Gly	Arg	Len			Gly	Pro	Ala
	010					015		•	•		020		5		
		Pro	Bro			Gly	Gla	Val	Cys	Aon	Fro	Leu	Asp	Ser	Leu
10879				į	036				3	035				3	040

(41) 73 Asp Low Asp Asn Thr Gln Low Asp Pho Val Ala Ile Lew Asp Glu Pro 1045 1050 Glo Gly Leu Ser Pro Pro Pro Ser His Amp Gln Arg Gly Ser Ser Gly 1060 1065 1070 His Thu Pro Pro Pro Ser Gly Pro Pro Asm Met Ale Val Gly Asm Met 1080 1088 Ser Vai Leu Leu Arg Ser Len Pro Gly Glu Thr Glu Phe Leu Asn Ser 1090 1095 Ser Ala 1105 (210) 12 (211) 3600 <212) DNA (213) Human <400> 12 coragacion agenciggae egogeatore gageceageg cocagacaga gigtoceau 60 accolociet gagacgoost gitcaacteg algaceceae caccasteag tagetsigge 120 gaşcentiget gieteceşge cetececaşt caşişgiyece nengiytişiy gacaynaşın 180 otgletagee egecutteig communaget americaigt reggeescen engilatgag 240 congections agreement of caregay greenacted effective coggregates 200 gionagetiga connecting grantifico atoloacete tgiongaigo cagodigano 360 cigoagaegy tiatoegoac cicacorage incoingtag etitoatesa cingogatge 420 acairtecas gaggetecia egytraiete tecatrigea ecatgagece ateletggga 480 tteccageec agaigaatea ecasaaaggg coetegeett cuttiggggi ucaguutigi 840 ggicoccatg actolyceog gggigggaig atorcacate cicagireng gggacentic 800 ecasettere agrigaagte igagriggae atgetegity grangigueg gyaggaacce 660 tiggaaggig alatgicong concambled acaggestan aggateenet gitggggatg 720 cisualssuc supagnect charagagas gasagesis asecisanic isistatsaa 780 acigacigos giúgggaigg elgoagosag gaatiigaci eccasgagoa geiggigeae 840 cacalesaca gogagescat ceaeggggag eggaaggagt legigigeea eiggggggge 980 tgolcoaggg agrigaggio officasagos cagtacatgo tggiggtica caigogcaga 980 caraciggre agaagreaca raagigeary tiigaagget geeggaagte atactearge 1920 cicqueanic igangacços Entgegyten cacaegggig agasgedeta estgegyan 1980 cargagget gragiaange etteageaat geeagtgace gagoraagea ceagaategg 1140 accesticca atgagaaged giatgiaigt asycteenig geigeneess acgetalans 1200 gatoctaget egetgegaa scatgteasg aragtgestg gtoctgacge ceatgtgace 1260 manossonec atgragatga occuctacet eggaceest contitetac ngtggagees 1820 auguggaage gagaaggagg tecenteagg gaggaaagea gaetgartgt geeagagggi 1380 genatgange canagedang contaggace enginated gengengiga enactedeeg 1440 gouggagig cascessiae agacasisgi siggmanism eiggenaige agagggange 1500

actgasged telegatt ggacgagga cettgatig etganery ictgened 1560 ettegeger tiggnerer cagningse engelande sachengen sataggane 1620 egggytetes sacigness ellyteerse acognises etgatereg eegotygge 1680 enecesstel etelegacy eegotygge agetenges gestesgele tgeetstat 1740 yetagenger geterfeet tieneerit geteense agagastygs 1800 gesteelee tgeetsgel tatgeetyee engesetsee tgeteesse agagastyg 1800 teageragg gyggtyste thegeenset gengesteen tgettegge anguitget 1860 teageragg gyggtyste thegeenset gengesteen gettygate gatagtygt 1920 elicensise elections angergage gyggateen gettygate gygagggang 2000 gengagyttes agageragg eegsteenst gengesge gteelgate gygaggang 2000 engagyttes agagerigg etgisteent seenseens etgisgeng gygaggang 2100

```
anottigate ettacetece ameetetgie imetemense ageeccoem emicaetgag 2160
antgeligoca tygaligotas aggyotaeng gaugagoong augtinggat ofecatggig 2220
ggcagtggic igaaccoris fatggactic ocecctacig stactciggg atstggggga 2280
colgangage cascagoles scottatega segasgegic cassotetet scotcitege 2340
ceiggteeas ceascaasta iggeeresse recigteess agraggeste atatestgae 2400
occalposad saadatgggg igagtidoot foccabtoig ggckgtaboc aggcccoss 2460
gotetaggig gaacetacag enagtgioot cyacitgaan attatggana agtgeaagte 2520
asgeragane sggggtgede agfiggggtet gaeterseag gselggenee etgeetesst 2590
godescodes gigsggggd, codspaices dagectatel filosopila coccessore 2640
ietoelevee astaletees ytessydeer talaceesge cacecortys thateteet 2700
iragaannea ggnetigeel ggaelittgat temneanne attocacagg geageteaag 2760
getongetig igigianita igilčanici caadaggayo tuotgüyega ugguyeğge 2820
agggangeig courageons gyanecited taccagagic connection ggggggited 2380
caggitaged caageogige taaagetoos gigaacacat aiggaceigg cittiggacec 2940
asottgocca steamsagun agatteetat ecoschoott nachatgenn tgassaittt 3900
giagigggg casalaggge ticaestagg geageagese cacelegaet telgeceepa 3060
tigoccantt getalgagod toloasagig agasgososa accocagoig iggicatool 3120
gaggigggen ggotaggagg gggteetgen tigtaccein eincegangg neagginigi 3180
mannecetigg antoletiga totigmessa metrageligg actitiginge tatletigal 3240
gageoceagg ggetgagtee tectestice estgateage ggggeagete tggacetace 3300
conceredet ergggedede chacargger graggemann tyngratiett metgagaren 1369
ctacctgggg amacagautt cetcauctet agtgeetaan gagtagggaa tetcatecat 3420
cacagatege atticotang aggitteint enticongan assitaggas agotacagte 3480
occigencia gaigocccag ggalgggagg laigggalgg gggclaigia tagicigiat 3510
acgittigas gasaasitts ataatsacae tsitteetsa taataaassa actsemicas 3600
(210) 13
(211) T106
(212) PRT
<213> Hussan
<400% 33
Met Piss Asa Ser Met Thr Pro Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro
                                     10
Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Gla Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr
             20
                                 25
Clu Cly Lou Ser Cly Pro Pro Phe Cys His Gln Ala Asn Leu Net Ser
                            48
                                                 4.5
Gly Pre Bis Ser Tyr Gly Pro Ala Arg Glu Ther Ash Ser Cys The Glu
                         35
Gly Pro Lou Pho Ser Ser Pro Arg Ser Ala Val Lys Lou Thr Lys Lys
                     76
                                         78
 85
Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu Asp Leu Gin
                                     90
                85
The Val He Arg The Ser Pro Ser Ser Leu Val Ale Pac Tie Asp Ser
            100
                                105
Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly Bis Leu Ser Lie Gly Thr
                            120
                                                125
Met Ser Pro Ser Led Gly Phe Pro Ala Gla Met Asa His Gla Lys Gly
    130
                        133
                                            1.60
```

Pro Ser Pro Ser Phe Gly Val Gin Pro Cys Gly Pro His Asp Ser Ala

148					150					155					168
Arg	Gly	Gly	Met	11e 165	Pro	Hi s	Pro	Gin	Ser 170		01 y	Pro	Phe	Pro 175	
Cys	Gin	î.eu	Lys 180		Glu	Len	Авр	Met: 185		Val.	Gly	Lys	Cys 190		Gli
Glu	Pæ	Leu 195		Gly	Asp	Met	Ser 200		Pro	Asm	Ser	Thar 208		He	Gla
Asp	Px0 210		£.es	Gly	Mex	Leu 215		СТу	Arg	Gle	Asp 220	Leu	Glu	Arg	Gli
61u 226	Lys	Arg	Glu	Pro	6lu 230		Val	Tyr	Olu	Thr 235		Cys	Arg		As; 240
Gly	Су	Ser	Gin	610 245	Phe	Asp	Ser	Gla	Glu 250		Len	Val	His	His 255	
Asn	Ser	Slu	His 280	Ils	His	Gly	Ģlu	år g 265		Glu	Pho	Yal	Cys. 270		Tri
Sly	Gly	Cys 275	Ser	Arg	Glu	Lea	årg 280		Pho	Lys	åla	Gin 285	Tyr	Met	Lin
Ya!	Val 290	His	Met	Ārg	Arg	His 298		Gly	Glu	Lys	Pro 300	Hiş	Lys	Сув	Tha
Phe 305	Glu	Gly	Cys	Arg	179 310	Ser	Tyr	Ser			Glu		Leu	Lys	Thr 320
His	Leu	Arg	Ser	His 325	Thr	Gly			Pro 330		Mei	Cys	6lu	Ris 335	GLu
Gly	Сув	Ser	Lys 340		Phe	Ser	Asn	Ala 345		Asp	arg	Ala	Lys 350		Gli
Asn	årg	Thr 355	Nis	Sex	Ass	Glu	1.ys 360	Pro	Tyr	Val	Cys	Lys 365	I.eu	Pro	G y
Cye:	Thr 370	Lys	Arg	Tyr	Thr	Азр 375	Pro	Sex	Ser	Leu	Ars 380	Lys	llis	Val	Lys
Th.r 386	Val	His.	Gly	Pro	Asp 390	åla	His	Val	Thr	1.ys 395	Arg	Bis	årg		Авр 400
Gly	Pro	Leu	Pro	årg 408	Ala	Fra	Ser	He	Sex 410	Thr	Yal	-61a	Pro.	Lys 415	Arg
G) e	Axg	Glu	61y 420	(1) y	Pro	He		6.bu 426	Glu	Ser	Arg	Leu	Thr. 430	Vsl	Pro
Glu	61y	Ala 435	Met.	Lys	Pro	Gln	Pro 440	Ser	Pro	Oly	Ala	61n 448	Sex	Ser	Cys
Sex	Ser 480	Asp	His	Ser	Pro	Ala 455	Gly	Ser	Ala	Ala	Asn 460	Thr	Asp	Ser	Gly
Vall 465	610	Mei	Bur	Gly	Aim 470	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr 475	Glu	Aop.	Leg	Ser	Ser 480
Lou	.åsp	Siu	61y	Pro 485	Cya	He	Ala	GLy	Thr 490	Gly	Leu	Ser		Leu 495	Årg
Arg	Leu	610	Asn 500	Léa	Arg	Lea	Asp	Gln 505	Leu	His	Gla	Levi	Arg 510	Pro	11e
Gly	Thr	Arg 515	Gly	l.eu	Lys.	Len	Pro 520	Ser	Leu	Sex	His	Thr 525,	Gly-	Thr	Thr

Val Ser Arg Arg Val Gly Pro Pro Val Ser Len Glu Arg Arg Ser Ser

		85													
	539					535					540				
Ser 548		Ser	Sex	lle	Ser 550		'Ala	Tyr	Thr	Va.I -555		Ars	Ārg	Ser	Se. 56
		Ser	Pro	Phe 565	Pro		Gly		- Pro - 570	Pro		Åsn	Sly	Ala 575	Se
Ser	Leu	Pro	GLy 580		Met	Pro	Ala	61s 589		Tyr	· Leu	Leu	Arg 590		Ar
Tyr	Ala	Ser 598		Årg	Gly	Gly	61y 600		Ser	Pro	Thr	Ala 608	Ala	Ser	Se
Let	Asp 810		He	Gly	Gly	Leu 615		Wet	Pxo	Pro	Tep 620		Ser	årg	Ali
61u 625		Pro	Gly	Tyr	Asa 630		āsn	Ala	(ily	Ye) 635		Arg	Arg	Ala	5e:
Asp	Pro	Ala	Gln	Ala 645		Asp	Arg	Pro	Ala 650		Ala	Arg	Val	G) ti 655	-
Phe	Lys	Ser	Leu 660		Суз	¥al	His	Thr 665		Pro	Thr	Yal	Ala 670	Gly	61)
G) y	Gla	Asn 675	Phe	Asp	Pro		Leu 680	Pro	Thr	5er	Val	Tyr :685	Ser	Pro	61.
Pro	Pro 590		Tle	The	કૃષિય	Asn 695		Ala	Met.	Asp	Ala 700		Gly	Leu	Gla
G)u 708	Glu	Pro	Sin	Val	Gly 710	Thr	Ser	West	Val	Gly 718		())y	Leu	åsn	Pre
Tyr	Net	Азр	Plie	Pro. 725	Pro	Thr	Азр	Tim	Leu 730		Tyr	Gly	Gly	Pro 735	611
Gly	Ala	ΑĬä	Ala 740		Pro	Tyr	Gly	Ala 745		Gly	Pro	Gly	Ser 750	Leu	Pro
læn	Gly	Pro 755	Gly	Pro	Pro	Thr	Asn 760	Tyr	Gly	Pro	Asn	Pro 765	Cys	Pro	Gir
Gla	Ala 770	Sec	Tyr	Pro	Asip	Pro: 775	Thr	Gla	(fla	Thr	Trp 780	Gly	Glu	Phe	Pro
Ser 785	llis	Ser	Gly	Leu	Tyr 790	Pro	Giy	Pro	Lys	Ala 795	Leu	Gly	Gly	Thr	Tys 804
Sex	Gln:	Cys	Pro	årg 865	Leu	6ls	Жз	Tyr	61y 810	Gln	Val	Gln	Val	Lys 815	Pic
Glii	Gln-	Gly	Cys 820	Pro	Val	Gly	Ser	Asp. 825	Ser	Thr	6) y	Lett	Ala 830	Pxo	Cys
Leu	åsn	Ala 835	His	Pro	Ser	Głu	Gly 840.	Pro	Pro	llis	Pro	Gia 845	Pro	Leu	Phy
Ser	His 850	Tyr	Pto	Gin	Pro	Ser 888	fro	Pro	61n	Tyr	Leu 860	Gin	Ser	Gly	Pro
Tyy 88A	Thr	01n	Pro	Pro	Pro. 876	Asp	Tyr	Leu	Pro	Sex	Glu	Pro-	Arg	Fro	Cys 880

Lou Asp Phe Ala Ser Pro The His Ser Thr Sly Gln Lou Lyn Ala Gln

Leu Val Cys Asn Tyr Val Gin Sør Gin Gin Giu Leu Leu Trp Giu Giy

Gly Gly Arg Giu Asp Als Pro Als Gia Glu Pro Ser Tyr Gle Ser Pro

908

920

890

929

885

900

88

```
Lys Phe Leu Gly Gly Ser Gla Val Ser Pro Ser Arg Ala Lys Ala Pro
                        935
Val Asm Thr Tyr Gly Pro Gly Phe Gly Pro Asm Leu Pre Asm His Lys
945.
                    960
                                        955
Sex 61y Ser Tyr Pro Thr Pro Ser Pro Cys His Glu Am Phe Val Val
               385
                                   970
Sly Ala Asa Arg Ala Ser His Arg Ala Ala Ala Pro Pro Arg Leu Leu
                                995
                                                    990
Pro Pro Lea Pro Thr Cys Tyr Gly Pro Lea Lys Vel Gly Gly Thr Ass
                          1000
                                               1005
Pro Ser Cys Gly His Pro Glu Val Gly Arg Lee Gly Gly Gly Pro Ala
                       1015
Leu Tyr Pro Pro Pro Glu Gly Gli Val Cys Asn Pro Leu Asp Ser Leu
                  1030
                                      1035
Aso Leu Asp Aon Thr Gln Leu Asp Phe Val Ala Ile Leu Asp Glu Pro
              1048
                                  1050
Gin Bly Lew Ser Pro Pro Pro Ser His Asp Gin Arg Gly Ser Ser Gly
           1080
                              1088
His Thr Pro Pro Pro Ser Gly Pro Pro Asa Met Ala Val Gly Asa Met
                                              1085
                          1686
Ser Val Leu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Glu Thr Glu Phe Leu Asn Ser
                       1095
Ser Ala
1105
<210> 14
<2117:3600
(212) DNA
<213> Human
<400> 14
```

consgatted agreedgase exeguators gagerosges coragaraga staterocae 60 accetectet gagacgeent giteaanteg atganceen canonaleng tagelatger UN gayoortget gretcegges enterceagt cagggggees coagtgiggg gacagaagga 180 etgicigge egeneticis comeranget ascelesist eeggeerees ragilategs 240 coagceagas agaceascas eigeacesas ageceacted tiletteico coagastaca 300 giosagtiga coassasgos agracigios atotoscoto tgiosgaigo esgeciggae 360 ergeagaegg trainggean elemneeage techniques etilicatesa elegegatge 420 acateticas sagsetecta eggicateté tenatigica coatgagece atetetagga 480 ticcoageco agatgaates cessaaaggg coetegeett cettiggggt ceagecligt 540 ggiorecain actorgodus ggytgggang atcoratate etcantecen gggacectic 800 ocaantigen ageigaagie igagelggae atgelggilg geaagigneg ggaggaacen 860 tigganggig statisteras econsactor anaggentar aggaterest stiggagais 720 etygniggge gygaggacet egngagagag gagaagegtg agentgaate tgtgtatgaa 780 antgeotioc gtigggatgg cigcagocag gaattigact cocaagagca gciggigeac 840 racateanca gogagenesi cesegggas egganggast tegistgees eigggggge 900 egotocaggg agotgaggor oftcamagon cagtheatge tagtgattea catgogoaga 960 campergacy agragamaca magigozog tilynaggyt groggaagic misctosoge 1020 cicgaaaacc igaagacgca retgeggtem cachogggtg mgaagcratm caigtgigag 1080 caegaggget geaglaange etteagesat geengtgabe gagecangea beagantryg 1140

```
accoattoca atgagaagoo giaigtatgi mageteeetg getgeacena acgetatnea 1200
 gatechagel ogetgogaam acatgicuag meagigeaig gicoigange comigigace 1260
 assoggosco gigggaigg occociyect ogggasceat ceatiteise agiggageee 1320
 aagaaggago gggaaggagg toocalcagg gaggaaagca gaetgacigt gocagagggt 1380
 govatgaago cacagovang cootgaggoo cagicatooi geagoagiga conciocoog 1440
 goasygasiy cascosatso agacasiggi giggacaiga ciggcaaigc hyggygcasc 1800
Bolgangson tolenagelt ggnegagggs coltgoatty otggemetes telstocant 1860
 citogocyco ityagaacci caggotygac cagotacate aactorygoo aatagygacd 1820
eggggioica ascignueag niiginocan accygianca etyiginong eegcgigge 1680
occupagnot ciptigasog cogragoage ageticages gestesgete igentaraet 1740
gleageegee getreteect ggesteinst theceasetg getreenach agagaatgga 1800
gestiction tgeriggert talgerigen cagesciace tgetinggge sagatatget 1860
tengerngag aggstagtar ticgoccart gengrators gretggatog gatagatgg: 1928
citoceatge ciccitggag sageogagee gagtateesg gataesacce essigesggg 1980
SEcaccogga gagocegiga occasocopy yeigetgace giectgeice agetasagie 2040
cogaggites agageoisag eigigicest accoracers eigigeage grangganas 2100
ascittaic cliacoiree asceteigte lacteucese agreecesag cateacigag 2160
antkutgoca tggatgolag agggotanag gangagonag aagitgigan oideatggtg 2220
ageastagic tgasecocts tatagactic concerncts atactetags statagassa 2280
ontgausges eastagriga gentlatega gegaggeste cassoletet geniettegs 2340
colggicuse coscossia iggererase secigioses agraggeste sisterigae 2400
occaccoming ammoninging transitioned tecemeters aggregated aggreechang 2460
gointaggig gaacetadag ocagigiest ogaciigaac atiaiggada agigesaate 2520
aagttagaat aggggtgttt agtggggiet gantosang ganiggesen etgenteast 2580
grocareroa gigaggger recaratera cagocietet riterratia occesagees 2540
infoctore antauctora gicaggerer talacceage carecestga italetter; 2700
tengaabees ggeettgeet ggaettiget teecceacee atteracagg geagetesag 2760
goicagefig igigiaalta igiicaatei saacaggage tacigiggga gggigggggc 2820
aggrasgate corregades grascetted taccagagic coasetilet graggetted 2860
caggitages caageegige tamagelees gigaacsesi siggacelgg clittggacee 2940
apoligocca picamagin aggitectat economicti daccatgora igamanitti 3960
ginginggy casainggy: tichcatage grageagese escriegaet telgereces 3000
ttgotüseti getaliggget telemaagig gguggesena seccesgeig iggicateet 3120
gaggtgggca ggctaggagg gggtortgoc tigiacocto ciccogaagg acaggtaigt 3180
ascecceing actiteings intigating detengeing metrigings battergan 3240
gagosceage ggetgagine instection catgateage ggggeagete tggacataen 3300
coacetocci organice cascatgget gigggeases tyagigtell seigagatee 3360
ctacetgygg sascagasti cetesseict agigeciass gagtagygas telesteest 3420
cacagainge attioning ggguitetal bertecagna anatigggg agergagge 1480
crotgeacas gatgecorsg systgsgagg tatgsgeigg gggetaigts tagteigtat 1840
acyttilyng gagasattig hisatgacac igtiteetga taataasgga actgeateag 3500
₹210> 15
(211) 1106
<212> PRT
(213) Hussan
<400> 15
Mot Phe Asm Ser Mot Thr Pro Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Cly Glu Pro
 1
                                     10
Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Gle Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr
```

25

		38 S													
Glu	Gly	Leu 35	Ser	G3.y	Pro	Pro	Phe 40		His	Gla	Ala	Asn 45	Lea	Set	Ser
GLy	Pro 80	His	Ser	Tyr	Sly	Pro SS		Arg	Glu	Thr	Asn 60	Ser	Cys	Thr	Olu
GLy 65		l.eū	Phe	Sec	Ser 70	Pro	Årg	Ser	Ala	Val 75	Lys	<b>(.e.)</b>	Thr	Lys	Lys 80
Årg	Åla	Leu	Sex	De 88	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp 90	Ala	Ser	Leu	Åsp	Leu 95	Gln
Thr	Val	He	Arg 100		Ser	Pro	Ser	Ser 105	Leti	Val	Ala	Phe	Ile 110	åsn	Ser
Arg	Cys	Tha: 115		Pro			Ser 120		Gly	His	Leu	\$er 125	Πe	Gly	Thu
Mert	Ser 130	Pro	Sex	Lau		Phs 138		Ala	Gln	Ret	Asin. 140	Hiş	9ìn	ŗăŝ	Oly
Pre 145		Pro	Ser	Mus	Gly 150	Val		Pro	Cys	G).y 188	Pro	llis	Asp	Sex	Ala 160
Arg	Sly	Gly	Mei.	lle 165	Pro	Ris	Pro	Gla		årg		Pro	Me	Pro 178	Thr
Cys	Gln	Leu	Lys 180		6la	Leu	Åsp	Met 185	Leu	Va(	Gly	Lys	Cys 190	Arg	Glu
Glu	Pro	Leu 195	Glu	Gly	Asp		Sex 206	Ser	Pro	Åsti	Ber	Thr 205	Gly	He	Gin
Assp	Pro 210	Leu	Leu	Gly	Wet	Leu 219	Asp	Gly	Årg	Glu	Asp 220	Leu	Glu	Års	Glu
61a 225		Arg		Pro		Ser	Val	lyr	Glu	Thr 235	App	Cys	Arg	Trp	Asp 240
Gly	Cya	Ser	Gin	610 245	Pho	Åsp	Ser	Gla	9.lp 250	Gin	Len	Val	His	His 258	ile.
Áşn	Sex	Ğlu	Hi s 260	He	His	(Fly	Glu	Arg 269	Lys		Phe	¥a1	Cys 270	His	Trp
ĠΣy	Gly	Cys 275	Ser	Arg	Glu	Len:	Arg 280	Pro	Phe	Lys	Ala	61n 285	Tyr	Met	Leo
ŸaJ.	Val. 290	His	West				Tha				Pro 300		Lys.	Cys	Tha
Phe 305.	Siu	Gly	Cys	Arg	310 Far	Sec	Тух	Sex	Arg	Len 315	6) u	Ása	Leu	Lys	Thx 320
	Leu	Arg	Ser	His: 325		Gly	Glu	Lys	Pro 330		Met	Cys	Gla	His 335	
Gly	Cyn	Ser	Lys. 340	áia'	Pho	Ser	Åsn	Åla 348	Ser	åsp	årg	Ala	Lys 380	Ris	6) n
Åsti	årg.	Thr 366	Bis	Ser	Asn		360 Lys	Pro	Tyr	val	Cys	Lys 365	Leu	Pro	6}y
Суя	Thr 376	Lys	Ars	Tyr	Thr	åsp 376	Pro	Sex	Ser	Leu	Acs 380	Lys	His	V43.}	Lys
Thr 385	Val	His	G) y	Pro	Asp 390	Ala.	Nis	Val	Thr	Lys: 395	Arg	His	Arg	Gly	Asp 400
Gly	Pro.	Leu	Pro	Arg 405	Ala	Pro	Ser		Sec 410	Thx	Val	Glu		Lys 415	Āxīg

		15.00													
Glu	Arg	Glu	Gly 420		Pro	He	Arg	GIo	Glu	Ser	årg	Leu	Thr 430		Pro
Glu	61.y	Ala 438			Pro	-Gla	Pro 440	Ser	Pro	Gly	Ala	61s 443	Ser	Ser	Суя
Ser	3er	Āsp	Bis	Ser	Pro	Ala	Gly		Ála	Ala	Asn 460	Thr	Asp	Ser	Ģly
Val 465			Thr	Gly	Asn 470	Ala		Gly	Sex	Thr 475	Glu	Asp	Less	Ser	Ser 480
	ásp	Glu	GLy	Pro 485			Ale	Gly	Thr 490	G) y	Leu	Ser	Thr	Leu 495	Arg
Arg	Leu	Gļu	Åsn 500		Arg	Len	Asp	61n 505	Leu		Gin	Leu	Arg 510	Pro	
Gly	Dur	árg 515			Lys	-Leu	Pro 520	Ser	Len	Sax	Hi,s.	Tar 525			Thr
Val	Ser 830	Arg	Arg	Va)	Gly	Pro 838	Pro		Ser	Leu	Glu 840	årg	årg	Sex	Ser
Sex 546			Ser	He	Sex 550			Tyr	Thr	Val 555	Ser	årg	Arg	Sex	Ser 860
Leu	Ala	Ser	Pro	Phe 565	Pro	Pro	GLy	Ser	Pro 870		Glu	Ass	Gly	Ala 575	Ser
Ser	Lett	Pro	Gly 580	Len	Met	Pro	Ålä	Gla S85	llis	Tyr	Leu	Leu	Arg 590	Åla	årg
Tyr	Ala	Ser 595	Ala	Arg	G] y	Gly	61y 600	Thr	Ser	Pro	Thr	Ala 608	Ma	Sex	Sex
£4893	Asp 610	Arg	Πe	Gly	Gly	Lep 615	Pro	Net	Pxo	Pro	Trp 620	årg	Ser	Arg	ĄΪa
610 825	Tyr	Pro	Ģly	Tyr	ăsn 630	Pro	Asn	Aia	Gly	Val 635	Thr	Arg	Arg	Ala	Ser 640
Asp	Pro	Ala	Gln	Ala 645	Ala	Asp	Arg	Pro	A1a 680	Pro	Ala	årg	Val.	Gin 655	Arg
Phe	Lys	Sær	Leu 680	Gly	Cys	Val	His	Thr 665	Pro	Pro	Thr	Val	Ala 670	Gly	GLy
Glγ	61n	Àsn 675	Pho	åsp	Pro	Tyr	Leu 680	Pro	Thr	Ser		Tyr 685	Ser	Pro	-Gla
Pro	Pro 690	Sec	Ile	Hir	Glu	Ašin 898	Ala	Ala	Met	dsb.	Ala 760	Arg	Gly	Leu	Gln
G19 705	Oju	Pro	Gla	Val	GLy 710	Tar	Ser	Mert	Vat	Gly 715	Ser	Gly	Leu	Asn	Pro 720
Tyr	Met	Āsp	Phe	Pro	Pro	The	Åsp	Thr	Leu	Gly	Tyr	Gly	Gly	Pro	Glu
Gly	Ala	Ala		725. 61.u	Pro	Tyr	Gly	Als	730 Årg	GŁy	Pro	Gly	Ser	735 Lea	Pro
Leu	Gly	Pro	740 Gly	Pro	Pro	Thir		745 Tyr	Gly	Pro	Asn	Pro	750 Cys	Pro	Mn
Gla		788 Ser	fyr	Pro	Asp		760 Thr	Gla	Glo	Thr		768 01 y	Glu	Phe	Pro
	770 His	Ser	Gly	Leu		775. Pro	Gly	Pro.	Lya		780 Leu	Gly	Gly	Thr	
785 Sax	63 a-	Pro-	Pro.	den	790 Lan	es e	\$\$ f e-	Twe	v13	795	Val	GI:	Va1	E area	800 Pres

				805					8:0					815		
Glu	Gla	Gly	Cys		Val	Gly	Ser	Aso		Thr	Gly	Less	Ala		Cys	
			820					828			·		830		·	
Lan	Asin	Ala 835	His	Pro	Ser	61n	61.y 840		Pro	His	Pro	Gln 845	fro	Leu	Phe	
Ser	Hi.s 360	Tyr	Pro	Cln	Pro	Ser 855	Pro	Pro	Gln	Tyr	Len 860	Gla	Ser	Gly	Pro	
1yr 865	Thr	Gin	Pro	Pro	Pro 870	Asp	Tyx	Leu	Pro	Ser 875	G}u	Pro	årg	Pro	Cys 880	
Len	Asp	Phe	Asp	Ser 885	Pro	Thr	His	Ser	Thr 890	Gly	Gin	Lgu	Lys	Ala 895	Oln	
Çeu	Val	Cys	Asn 996		Val	Gln		61n 905		Glu	Leu	Leg	Trp 910		GTy	
Gly	Gly	Arg 915	61.0	Asp	Ala	Pxo	å1a 920	61n	Glu	Pro	Ser	Tyr 925	Gln	Ser	Pro	
Lys	Phe 930	Leu	Gly	Glu	Ser	61n 935	Val	Ser	Pro-	Ser	Arg 940		Lys	Ala	Pru	
Val 945	Asn	Thr	Ter	Gly	Pro 950	Gly	Phe	Gly		Asn 985	Leu	Pro	Asm	His	Lys 960	
Ser	Gly	Sex	Tyr	Pro 965	Tur	Pro	Ser	Pro	Cys 970	His	G) u	Asn	Phe	¥81 975	Val	
Gly	ålä	Asu	Ars 980	Ala	Sex	aiff	Arg	Ala 988	Ala	šla	Pro	Prio	Arg. 990	Leu	Leu	
Pro	Fro	Leu 995	Pro	Thr	Суз		GLÿ (000	Pro	Leu	lyş		61y 1005	Gly	Thr	Asa	
	Ser 010	Cys	Gly	His		61u (015	Val.	Gly	Arg		61 y 1020	Gly	Gly	Pro	Ale	
		Pro	Pro			Gly	Gln	Val			Pro:	Leu	åsp			
1025 4		ð	A		(030 (030	East	0.755	333		812	3 100	نيم ٤	d.o.o.		3949 Dun	
1996	1255	nng.	Ann	045	W1.88	1745/3	any		050	. 28.1 53	381 8.	2566		1055	C 1.55	
GIn	Gly		Ser 1060	Pro	Вo	Pro		fiis (065	Asp	Gla	Arg.		Sex 076	Ser	61 y	
llis		Pro 1075	Pro	Pro	See		Pro 1080	Pro	Aisn	Met		Val. 085	Gly	Ash	Met	
	Val 090	l,eu	Leti	Arg		Leu 995	Pro	Gly	Ğla		Glu 100	Phe	Leu	åsn	Sex	
Sex	Als															
1105																
(210	(). JE	}														
<211	> 36	100														
<212	) <b>38</b>	M.														
(213	> #	18333														
	3.5															
															eccas	
3000	tcot	.81 9	agac	2008	1 28	teas	eteg	ste	aces	cae	cacc	Balc	ag i	agel	atgge	: 120

gageertgei gteiergger eetreerast cauggageer coastatgg garagaagga 180 etgteigger egecatteig ocandaagut aansteatgt enggeneera cagttaiggg 240 enageeagag agaceancag etgeneegag ggernactot itteitete coggagiges 300

gicangitys coangaages greattier nictemente lytegrater careetgran 360 cigosgaegg italorgese cleacecage torriogras cittosless elegresige 420 acatotecng gaggementa aggicateta tecattggen centgagnoe atciatgggm 480 ttoorageer agatgaatra eraaaaaggg coetegrett cettiggggt erageetigt 540 ggtocreaty acietycory gggtgggatg atoccaeate steagteery gggaccette 600 consolityce ageignsgue igageiggse algeiggitg gesagtgeeg ggaggaache 660 tigganggig statgiceng concamtor acaggestar aggatecent gliggggatg 720 cismatseme sepagnacci reasagagas gagaagesig ageetsaate igistatsaa 780 acigaeigoo giigggatgg otgoagoeag gaaittgast cocaagagoa gotggigeac 840 ondatesara gegagearat reneggigas eggnaggast teststyces etggggggge 900 tgeincaggy agetgagged etteamaged cagimentge tggtggites emigegemaga 360 czentggeg zgazgodacz czzgtgezeg titgazggi geeggzzgte ztzetezegi 1020 ctoganance tgangaogea colyeggica cacaegggig agaageesta catgigigag 1090 cargaggget gragtanage ettrageaat geragtgace gageraagea coagaategg 1140 accestices atgagaagee gtatytatyt aageteeetg getgeaceaa aegetataca 1200 gatoctaget egetgegaaa acatgicaag acagigesig gioctgaege ecatgigace 1250 asseggeset giggggatgg beteetgeet egggeseest coattictse sgiggsgees 1329 anganggang gaganggang teccatengg nagganagta natinatigt necananggi 1350 gocalgaage cacagecaag centggggoo cagteateel geagnagiga chacteroog 1440 gragggagtg cagecaatac agacagtgyt giggaaatga otggcaatgo agggggesge 1900 actymagace fetecageti ggacgaggga cettgeattg etggeaetgg tetglecaet 1560 citegeegee itgagameet eaggetggam eagstacate aastenggen aaiagggann 1820 eggggtefta dentgbonag ettgiondad aceggtabos etgtgtendg degegtgggd 1680 occocaștet etetipasce ecgeageage agetecagea genicageic igeriataci 1740 gtesgerger géterteert gyértéteet treéceretg geteressée agagaatgga 1800 genteeteec tgectggeet tatgeetsee cageoctace tgetteggge sagalatget 1860 tragonagas eggstygian tingocoact gnagoatoca goolegaling gataggigd 1920 citecestge ctechtggag sageogagee gagtajeesg gstacasere caatgeaggg 1980 gtomornega gegoriagiga conagornag grigorgaco giorigoiro agriagagio 2040 cagaggitea agageetagg etgisteest accepacesa etgiggeagg agaggacas 2100 machtigaic citacciece asceletgie tacicaccae agreecersag esteartgas 2160 maightgeen tygatgeing agggeindag gmagagdeag magtigggad stocatggig 2220 ggeagtiggio tgaaccecta tatgyactte coacetactg atactetiggg afatgiggga 2280 cetgaaggg cageagetga geettatgga gegaggggte caggetetet geetetiggg 2340 entggionac mescauscia tggmeccane contgionec ageaggeein stateeigse 2400 consecuting assestings transferent tendscipts spotstacce assuccess; 2460 geteragging gaseetheag scapitytest egactigase attauggsen sgryesagie 2520 aagocagaae aggggigoon agiggggint gantoranag gantagesen otgenteaat 2580 geoesceesa gigagggger eccasatees cagenteist tittecestia occidações 2640 telecteese autaleiesa givaggeese taluereage eacceeiga traiciteet 2700 teagaacera ggeettigeet ggaetifyat teecepacer afficaragg gragetcaag 2760 gotcagotig igiginalka igitosatot chacaggago tarigisgga gagiggaggo 2820 aggrangaly occurrence grancelles incompagie commetiest gazgratice 2880 casstinged cassedsted tanasctera signacedat atasacciss cittssacce 2940 mantigeres afrecassic aggineral coraccerti carcaignes igassatiff 5000 giagtggggg cashiagage itcacatagg geagnagean cancingaci telencocca 3050 tigoreacti gotsigagoo isicasagig ggaggoacas annocagnig iggunatori 3120 gaggigggea ggetaggagg gggtedigte tigiaceeté elecegaagg acaggiatgi 3180 sacceretgy activities tollescase actempting actitifies talletgest 3240 gayecceagy gyetgagtée testectice estgateage gyygeagete iggaestace 1300

cca	cetò	eet	ctgg	goco	oc d	aaca	tgge	t gt	gggc	aaca	tga	gtgt	ott	actg	agatée	3360
088	cetg	ess	8880	3839	tt c	ctea	ecto	t ag	tgcc	tasa	gag	tagg	gaa	tate	atecat	3420
080	agat	ege .	atik	cotes	ar g	ggtt	icla	£ 681	etoc	agaa	888	teg	888	age t	goagto	3480
các	tgen	088	gaig	0000	ag g	gate	garg:	g ta	tggg	otgg	888	etat	gla	tagt	eigiai	3840
															osteag	
	0> 1															
<21	i) li	048														
	2> P															
	3> H															
	()> 1°															
			Ser	Met	Thr	P230	Pro	Pro	He	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gla	Pro	
1				5					10			•		35		
	Cvs:	1.655	Are		£ 4233	fire	Ser	Gla		A.ba	Pro	Sen	Va 1		Thr	
	V. J. 11	25.5	20			-,	7	25	7.4.3	12.12			30	,	***	
Obs	Olv	1 2013		G) v	Present	Pro	Pho		His	Glu	Ala	A 5 %		Mar	Ser	
3,4	12.E g	39	Cr. 3.	24.25.3	3 ,0 0		40	6.3.60	2022	O XC	2.84.68	45		0000		
CEn	Dea		Sar	Ther	Ole	Dwn.		Arn	æ.	Thr	Son			332r	CI.	
37.3		\$1.5 %	46615	533	35 8 3	55	(1.42)	ers '8.	03.0	3 461	60	400000	coyo	3.450.	C7 3. 13	
C.S.,	88	£ - 25	Mes	Case	Suc		Ann	a.	33.5	Ma 3		3 000	Min	Eve	Erro	
	33.17	seq	1310	393		0.855	AM S	oex	25.5	Val 75	1953	\$250.40	2 13 E	67.2.19		
65	11.	دنہ }	E was	F1.	70 	Barre	t	Van	don		Car	1-444	kan	£ 2.55	80°	
MER	Rin	seu	26%		our	r s ts	s.eu	396		Ala	OSS	resi	Mays		3533	
98	Sr. Y		A	85	185	Asia	S	Ď.,,,,	90	373	81	73k	Ϋ́Υ	98	0.1	
m	883	Lie		1.013.	383	13.80	Sex		1.680	Val	ana	1,666		.888	26%	
		A22	100			49.2		105	zá.		v.	Ā	110	23.5	on) .	
Arg	Uys		Sec	37.8165	Sily	213		Tyr	GLy	His	Leu		118	biy	im	
		113					120					125				
Mex		Pro	Ser	U93	Gly		820	Ala	Gin	We ;		Mis	tiln	L.y.s	GLy	
	136					138					140					
							4									
	Sex	800	283.	Pag		va.	Gin	Fro:	Gys	Gly	NY 0	\$13.53	880	Sex		
145					150	·		-ta 10		155		0.	***		160	
arg	Gly	Gly	Met		Pro	His	1,333	GES		Arg	GLy	Pro	Fhe		Thx	
				165					170					175		
Cys	Gla	Less	Lys	Set	Giu	Leu	Asp	Set	Leu	883	Gly	Lys		Arg	Glu	
			180					185					190			
G.Co.	\$10	Les	Glu	Giy	Asp	Set	Ser	Ser	Pro	Asm	Sex	Thr	Giy	He	Gla	
		195					200					200				
Asp	Pro	Leu	Len	Gly	Met	Leu	Asp	Sty	Arg	Glu	Азр	ten.	6313	Arg	Gla	
	210					215					220					
$G \downarrow u$	Lys	Arg	Glu	Pro	Gla	Sec	Val.	Tyr	613	Thr	Asp	Суя	ÁXŒ	Trp	Asp	
225					230					235					240	
$G (\nu)$	Cys	Ser	Gln	Glu	$p_{he}$	Asp	Ser	ĞĬn	$(1)_{0}$	${\rm Gln}$	Leu	Val.	His	His	$\Pi_B$	
				245					280					255		
Asn	Ser	Gla	Bis	Ile	His	(3), y	Glu	Acg	Lys	Thu	Phe	Val.	Cys	His	Tep	
			260.					268					279			
Gly	Çly	Cys	Ser	Arg	Gu	Leu	Årg	Pro	Phe	138	Ala	Gla	Tyr	Mest	Len	
		275					280					285				
Val	$V_{B}$	His	Set.	Arg	Arg	Ms	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	16.6	Lys	Cys	Dar	
	296					295					300					
Pho	Glo	61.y	Cys	Árg	Lys	Sex	Tyr	Ser	Arg	Let	Olu	Ásta	Leu	Lys	Thr	

		101														1333
306					310					315					329	
Hís	Leu	Arg	Ser	His 325	Thr	Gly	Glu	Lys	330 330		Met	Cys	61u	Hi o 335	Olu	
Gly	,Cys	Sex	Lys 340	Ala	Pho	Ser	Asn	Ala 345	Ser	Amp	Arg	Ala	Lys 350	His	Gin	
åsn	Arg	Thr 358	His	Ser	åsa	Glu	Lys 360	pro	Tyr	Val	Čyε	Lys 365	Leu	Pro	Gly	
Cys	Thr 370		Arg	Tyr	Thr	Аар 375		Ser	Ser	Leu	Arg 380	Lys	His	Val	Lys	
Thir	Ya]	Bis.	Gly	Pro	Asip 390		His	V13 ]	Thr	Lys 395		His	Arg	Gly	Åsp -400	
	Pyo	Len	Pro	Arg 405	Ala	Pro	Ser	He	Ser 410	Thr	Yal	Cla	Pro	Lys 415		
Gie	Arg	Glu				He	Arg				årg	Lett			Pro	
Glu	Gly	Ala 435	420 Net	Lys	Pro	Gln		428 Ser	Pro	Gly	Als		430 Ser	Ser	Сув	
	.,		827	ي د	**		440	·	5.1	. A.'i		448	š	0	Totu	
	Ser 450					458					460					
Va.1	Glu	Met.	Thr	Gly	Ash 470	Ala	Gly	Gly		Thr 475	Giu.	Asp	Less		Ser -480	
Len	ÅSÞ	Glu	Gly	Pro 485	Суз	He	Ala	.01y.	Thr 490	Gly	Len	Ser	Thr	Leu 498	Ars	
årg	Leu	Glu.	Asai 500	Leu	Arg	Leu	Asp	61a 505	Leu	His	G)n	Leu	Arg 510	Pro	He	
Gly	Thr	Ang S1S	Gly	Leu	Lys	Leu	Pro 520	Sex	Leu	Ser	His	Thr 525	Gly	Thr	Thr	
Val	Ser 536	Arg	Årg	Ya).	Gly	Pro. 535	Pro	Val	Ser	Leu	Glu 540	årg	årg	Sex	Sex	
Ser 545	Ser	Ser	Ser	lie	Ser 550	Sec	Ala	Tyr	Thr	Val. 885	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser 560	
Leu	Ala	Ser	Pro	Phe 565	Pro	Pro	Oly	See	Pro 570	Pro	GLu	Asu	Gly.	Ala 876	Ser	
Sex	1.83		61y 580	Leu	Wet	Pro	Ala	GIn 586	His	Tyr	Lea	Leu	Arg 590	Ala	årg	
Tyr	Als	Ser 595	Ala	Arg.	Gly	Gly	G1.y 600	Tur	Ser	Pxo	Tha	Ala 695	Ala	Ser	Ser	
Leu	Asp	Arg	lie	ĜLy	Gly		Pro	Met	Pro	Pro	Trp 620	Arg	Ser	Arg	Ala	
G18 625	610 Tyr	Pro	G) y	Tyr	Asn 630	615 Pro	Åsn	Ala,	Gly	Val		Arg	Årg	Àla	Ser 640	
	Pro	Ala	(On	Ala 645		Asp	Arg	Proj	Ala 689		Alu	Árg	Val.	Gln 685		
Plie	Lyn	Ser	Leu 660		Cys	Val	His	Thr 665		Pro	Thr	Val	Ala, 670.		<u>61</u> y	
Oly	Gln	Asia 675		Asp	fro	Tyr	Leu 680		Thr	Ser	Val	Tyr 685		Pro	Gla	
Pro	Pro		i le	Thr	Glu	Asn		Ala.	Met	Asp	Ala		Qly:	Leu	Gla	

	890					698					700				
61a 705	6lu	Pro	Glu	Val	61y 710		Ser	Met	¥s)	GLy 715		Sly	Leu	Åsn	Px0 729
Tyr	Met	Asp	Phe	Pro 725	Pro	Thr	ÁSÞ	The	Leu 730		lyr	Gly	Gly	Pro 735	
Gly	Ala	Ala	Ala 740		Pro	Tyx	Gly	Ala 745		Gly	Pro	Gly	Ser 780		Pro
Leu	Gly	Pro 788	Gly	Pro	Pro	Thr	Asin 760	Tyr	Gly	Pro	Asn	Pro 765	Cys	Pro	Gla
Gin	Ala 770	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pró 775	Thr	Gln	Gła	Thr	Trp 780	Pro	Pro	Hi.s	Pro
61n 785	Pro	Leu	Phe	Ser	His 790		Pro	Gln	Pro	Ser 795	Pro	Pro	Glts	Tyr	Leu 800
Gla	Ser	Gly	Pro	Tyr 805	Thr	Gla	Pro	Pro	Pro 810	Asp	Tyr	Leu	Pro	Ser 815	Glu
Pro	Arg	Pro	Суя 820	læu	Asp	Pho	Asp	3er 825	Pro	Thr	His	Ser	Thr 830		Glu
Leu	Lys	Ala 835	Gin	Leu	Vai	Cys	Åsn 840	Tyr	Val	Gln	Ser	61a 845	Gln	Glu	Leu
Leu	Txp 850	Glu	Gly	Gl.y	Gly	Arg 855	Glü	Asp	Ala	Pro	Ala 860	Gla	Glu	Pro	Sex
Tyt 865	Gin	Ser	Pro	Lys	Phe 870	Leu		Пу	Ser	61n 875	Val.	Ser	Pro	Sex	årg 880
Ala	Lys	Ala	Pro	Val 885	Asn	Thr	Tyr	Gly	Pro 890	Gly	Phe	Giy	Pro	Asn 895	Leu
Pro	Àsu	His	Lys 960	See	Gly	Ser	Tyr	Fx 6 905	Tha	Pro	Sex	Fro	Cys. 910	His	Glu
Asn.	Phe	Val 915	Val	Gly	Ala	ăsn	Arg 920	Ala	Ser		Axig		Ala	Ala	Pro
Pro	Arg 930	Leu	Leu	Pro	Pro	Leu 938	Pro	Thr	Cys	Tyr	GLy 940	Pro	ten	Lys	Val
61y 945	Gly	Dur	Asn	Pro	Ser 980	Сув	Oly	His	Pro	61n 988	Val	61y	Arg		01y 960
Gly'	Gly	Pro	šia	Leo 965	Tyr	Pro	130	Pro.	61n 970	Gly	G).ni	Val	Cys	Ašn 975	Pro
Leti	Asp	Sex	Leti 980	Asp	Leu	Asp	Asn	Tha 985		J.69	Åsp	Phe	Val 990	Ala	He
Lau	Asp	61a 995	Pro	Gin	Gly		Ser 1000	Pro	Pro	Pxo		His 1005	Asp	Gla	Arg
	Ser 010	Ser	Sly	His	Thr	Pra .015	Pro	Pro	Ser		Pro 1020	Pro	Asn	Met	Aia
Y&L	Gly	Aso.	Set	Ser	Val	Leu	Lett	Arg	Ser	Len	Fro	Oly	Głu	Thr	Sin
1025	,			.3	638					1035				3	.040
Phe	Leu	Asn			Ala										
			}	.045											
<210	t														
(2H)															
<212 2019															
<b>K233</b>	2 888	2003B													

(400) 18

occagactor agreetgyme egogeatece gagernageg coragacaga grytererae 60 seccipotol gagaegorat gitoaalteg aigaerecae caccusicag lagetaigge 120 gagocetgot stotergger octrocoast caggyggere cragtstygg garagangsa 180 eigteiggee egecetteig coacemaget saccteatgt enggereces cagitaiggg 240 ceasceasas asaceaacas etgeacesas sseecactet littelletee begsastsea 300 giosagiiga comagaegog ggoactgice ateinaceic lyinggaige cagesiggas 360 etgeagaegg ttaleegeae efeacecage tecclegtas etileateaa etegegatge 420 anatiticay gaggetecta eggtealete becalliggea cealgageer aleteligga 480 rtecongect agangasins commanage tootegooti conreggest congective 540 ggiococatg actorgocog gggigygnig alcocacate ctcagtecog gggaccette 500 connectines anotherate transferred aigetrates acaminos grangements 560 tiggaaggig atsiglocag soccasoics acaggoalac aggaissoci giiggggaig 720 ciguatgage gagaggaeci egagagagag gagaagegtg ageetgaate tgigtatgas 780 actypolyno gitygyatyg ctycayocay yaaittyant chosayayca yolyytycan 840 caesicases gegageaest ecaeggagag egganggagt tegtgigees etgggggggg XV tgotroaggy agotgaggoo ottoasagoo cagtgoatgo tggtggitca catgogoaga 960 cacarigges assagement caustsmans ittsmassi seessassic stanteacse 1920 ctogammee tgaagnogen cetgoggton emesogygtg agaagcoats catgtgtgag 1980 cacyaggyet geagtamage ettengeant geengtgace gagecongen ceagnatugg 1140 accentices algagaagee glaigiatgi asgeteectg getgeacesa acgetataes 1200 galectaget egetgegesa unalginaag acagigeaig ginetgange coaigigace 1250 asseggesee gtggggsigg eécectgeet egggeseest coatiteise agtggsgeer 1320 anguagasuse agguagguaga recentenga suggenance anethnetat necesangai 1380 genaigange cheagecamp ceetggggee captesfect gengengiga concluency 1440 geogggagig engerantae agaengiggi giggaaniga eiggeanige agasggoage 1500 actgaagace telecagelf ggaegaggga entigeatig diggeacigy telytebact 1560 erregeegee tigagaacer caggerggas cageracare aacteeggee salagggase 1620 eggsgtetes nactgeeesg entgleeese seegglaces engigleeeg eegeglgsge 1680 occusagiot ciettgaacg ecgeagoage agelecagea gealeagele tgestaimet 1740 groupeger getecient specietest tierseceig getecerace agagnatyga 1890 gealentene tgeetggeet latgerigee engenetaen tgetteggge angalatget 1890 teageragag ggggtggtae ttegereact geagesters geriggateg gataggtggi 1920 citocratgo otocitggag saggogago: gagtaineag gataraacec castgonggg 1986 gionecegga gggeengiga scengeceng geigeignne giccigetee ageingagte 2040 cagaggites agageotygy etgigteest sciencacies etgiggesgy gygaggarag 2100 ascirtgate chiacofoce ascetetyte tacteacese agoccessay calcactyay 2160 asignigons ignations asignises gasgacos asignigas nicesigis 2220 ageastggic tgaaccecta iatggactte concetacis stacteiggg atsiggggs 2289 cotganggag cagcagoiga goottalaga gogagaggic caggetotot gootstigag 2340 cotgyteean ceanchasta iggecennae motgtoom agraggeste atatosigas 2400 eccarceasy mandatgysy typyttenet incommicin gyetytanec mygeconasy 2460 geteraggig gascriscay ecagigment rescripsar situiggaes sytgesagic 2520 basicasuse assegtecce agissegtot sactocacas sacissease ciscolinai 2580 greeneceres gtyaggyger creasuters cagnetetet titeccatta conceaguee 2640 térreterre astatérora gteaggeere talacceage racceretga tialettérit 2700 tragamerea agentigent agantitical teconomico mitreamaga gragationes 2760 geteagetig tgigtaaita igiteaatet caacagyage tacigigga ggglggggge 2820 agggaagsig occuraces agaabeliee inceasuric coangilist gagggattes 2880 engginagee baageogign taangeinda gigaarubah atggacelgg ciittggacee 2940

```
ascingeres steamaste aggitectat consececti escentgera igassaitti 3000
gragtggggg casatagggg ticacatagg goagcagoac cacciogact tetgoccoca 3060
iligocomett getmiggges telemmagis ggmaggamemm meccempoig tggicatest 3120
gaggigggea sgelaggagg gggiootgoo tigtacceto etecchangs acaggiafgt 3180
associated activities tolligeness scheeging activities tellinteget 3240
gageodenge ggetgagter tectrotics catyateage gaggeagete tagacatace 3300
concelerat enggeneer cancatget gigggenach igngigtett actgagnice 3360
ctacetgggg assessatt ectemetet agtgeetaan gagtagggam tetenteent 3428
escapatogo attinotasy gystitotai cottocagas asattggggg agotycagto 2480
Sociasses gargecous systems tatespette generates tagtetetat 2540
acguttitgag gageestitg atestgacac tguttectga tastasagga actgomicag 3600
₹210> 19
<211> 1596
(212) HO
(213) Nouse
<400∑ 19
Not Glo Ala Glo Ala Bis Ser Ser Thr Ala Thr Glu Arg Lys Lys Ala
 1
                 â
                                   3 ()
Glu Asm Ser He Gly Lys Cys Pro Thr Arg Thr Asp Val Ser Glu Lys
                              25
Als Val Ala Ser Ser Thr The Ser Ash Giu Asp Glu Ser Pro Gly Glo
            40
lle Tyr His Arg Glu Arg Arg Asn Als He Thr Met Glo Pro Gla Ser
             88
Val Gla Gly Leu Asa Lys Ile Ser Glu Glu Pro Ser Thr Ser Ser App
                                     75
                  76
Glu Arg Ale Ser Leu Ile Lys Lys Glu Ile Bis Gly Ser Lem Pro His
                                   90
                85
Led Ala Glu Pro Ser Led Pro Tyr Arg Gly Thr Vai Phe Ala Met Asp
                                     110
           100
                            108
Pro Arg Asm Gly Tyr Met Glu Pro His Tyr His Pro Pro His Lew Phe
                          120
Pro Ala Phe His Pro Pro Val Pro Ile Asp Ala Arg His His Glu Gly
                                  1.40
                     135
Arg Tyr His Tyr Asp Pro Ser Pro The Pro Pro Leu His Val Pro Sex
                   150
                                    188
145
Ala Leu Ser Ser Ser Pro Thr Tyr Pro Asp Leu Pro Phe Ille Arx He
               165
                                 170
Ser Pro His Arg Asm Pro Thr Ala Ala Ser Glu Ser Pro Phe Ser Pro
                185
Pro His Pro Tyr Ile Asp Pro Tyr Met Asp Tyr Ile Arg Ser Leu His
                                          205
                        200
Cys Ser Pro Ser Lou Sex Met Ile Ser Ala Ala Arg Gly Lou Sex Pro
                     215
                                         220
The Aup Ala Pro His Ala Gly Val Ser Pro Ala Glu Tyr Tyr Mis Gla
                   230
                                      235
Met Ala Leu Leu Thr Gly Gla Arg Ser Pro Tyr Ala App Ila Leu Pro
                                  250
```

Ser Ala Ala Thr Ala Gly Ala Gly Ala Ila His Met Glu Tyr Leu His

			260					286					270		
Als	Met	Asp 275	Ser	Thr	årg	Phe	Pro 280	Ser	Pro	Arg	Leu	Ser 235	Ala	Arg	Pro
Ser	års 290	Lys	Årg	Thr	Leu	Ser 295	lle	Ser	Pro	Leu	Ser 300	Asp	His	Ser	Phe
Asp 205	Lew	Gin	Thr		11e 310	Arg	Thr	Ser	Pro	Asn 315		Len	Val	The	11 <i>a</i> 326
Leu	Asn	Asn	Ser	Arg 325	Ser	Ser	Sex	Sax		Sex		Ser	Tyr	61y 335	His
Leu	Ser	Ala	Ser 340	Als	He	Ser	Pro	Ala 345	Len	Sen	Pho	Thr	Tyr 350	Pxo	Ser
Ala	Pro	Yal 385	Ser	Leu	His	8et	His 360	6In	Gln	He	Leu	Ser 365	Arg	Gln	Gin
	370					375					380				Ala
Pro 385	Thr	Phe	Pro.		61n 390	årg	Pro	He	Pro	61y 398	Lie	Pro	Thr	Va)	Leu 400
Asb	Pro	Val	Gla		Ser		Gly	Pro		Glu		Ser	Gin	Sex 415	Lys
Pro	Thr	Ser	61u 420	Ser	Ala	Val		Ser 425	Thr	@}\$	Gly	Pro	Met 430	His	Aøn
	-14	435					440					445			Ser
Årg	Gly 460	Gin	Gin	Ġłu	Gla	Pro 458		Gly	Thr		Leu 460	Val	Lys	Glu	Glu
Ala 465	àsp	Lys	Asp		Ser 470	l.ys	Sin	GIu	Pre	61u 475	Val	116	Tyr	Glu	Thr 480
Asn	Сув	His	Tep	Glu 485	Gly	Cys	Thr		61u 490	Phe:	Åsp	Thr	Gla	Asp 495	Gin
Leu	Va)	His	His 500	He	Asa	Ash	Àsp	His SO5	He	Bis	Gly	Glu	1.ys 510	Lys	Glu
Phe	Val	Cys 519	Arg	Trp	Len		Cys 520	Sear	årg	Glu	Gin	Lys 525	Pro	Phe	Lys
Åla	61n 830	Tyr	Mex	Leu	¥a}	Val. 535	His	Set	Arg	Arg	Hi.s 540	Tar	Gly	Olu	Lys
545					550					555					Leu 860
				865					570					575	Tyr
			880					885					890		QuA
årg	Ala	Lys 595	His	Gla	Asn	Arg	Tha: 600	His	Sex	Asp	Glu	Lys 608	Pro	Tyr	Val
Cys	Lys 810	He	Pro.	Gly	Cys	Thr 618	Lys	Arg	Tyr	Hir	Asp 620	Pro	Ser	Ser	Leti
625					630					635					Lys 640
Ĺÿs	Ğla	årg		Asp eas	368	His	Pro	Ārg	Pre 856	Pro	Pro	Pro	årg	Asp ass	Ser

		111													
Gly	Sex	His	Ser 660		Ser	årg	Ser	Pro 685	Gly	Arg	Pro	Thr	61a 670	ВĮу	Ala
Phe	Gly	61u 678	Glu	Lys	Glu	Leu	Ser 680	Asn	Ther	Thr	Ser	Lys 685	Årg	Glu	Glu
Суз	Cen 696	Gla	Val	Lys	The	VaI 695	Lys	Ala	Glu	Lys	Px0 700	Met.	Thr	Sex	Gla
Pro 705		Pro	Gly	(Ly	61a 710	Ser	Sex	Cys	Sen	Ser 715		Gla	Ser	Pro	ile 720
		Tyr	Ser	Asn 725	Ser	Gly	Leu	Glu	Len 730			Thr	Ásp	61y 735	
Sex	Val	Åla	Asp 740		Ser	Ala	He	Asp 748	Glu	Thr	Pro	lie	Met 780		Ser
Thr	Πe	Ser 755		Ala	Thr		Ala 760			Leu	Gln	Ala 765		Arg	Assi
Pro	Ala, 770		Thr	l.ya	Tep	Met 775	Glu	His	He	Lys	Leu 780	Glu	årg	Leu	Lya
Gln. 785		Asn	Gly		Phe 790	Pro	Arg	{.eu		Pro 795	He	Leu	Pro	Sex	Lys 800
Ala	Pro	Åla	Val	Sex 805	Pro	Lep	He		Asu 810	Gly	Thr	Gin	Ser	Asn 819	Asn
Åse	Tyr	Şer	Ser 820	Sly	Gly	Pro	Gly	Thr 825	Leu	Leu	Pro	Ser	Ars 330	Ser	Åsp
Leu	Sex	61y 835	Val	Asp	Pixe	The	Va 1 840	Læu	Asp	Thr	Leu	Asu 845	Årg	Ätg	Åsp
Sex	Asn 880	Thr	Ser	Thr	He	Ser 855	Ser	Ala	Tyr		Ser 860	Ser	årg	årg	Ser
Sex 865	Gly	11.0	Ser	Pro	Cys 870	Phe	Ser	Ser	Arg	års 875		Ser	Glu	Ala	Sex 880
(i) n	Ala	Glu	Gly	Arg 888	Pro	Gln	Asn	Yal	Ser 890	Va]	Ala.	Åsp.	Ser	Тух 895	Asp
			909		\$la			906					910		
		918			Leu		920					925			
	930				Ala	935					940				
948					Arg 950					955					960
				968	Ser				970					975	
			980		Gly			985					999		
		998			Leu	3	000				1	3006			
	1010.					015					020				
Ser	Sex	1.00	Aim	Ser	Pho	Asn	Pro	Bo	Acm	1.60	rro	rro	261	Yal.	GIS.

	1 1-G			.76	NO.				173
	HS Sør Le	n Val I	len Gle	Asn T	vr Thr	Arg Gla	Gla S	Ser Ser	Gb
min (ma)	002 00	1045		144401 3		and min		1065	
Pro Arg	Tyr Flo	e Gla A	lla Ser	Pro C	ys Pro	Pro Ser	He T	thr Gha	Ass
		0			85			176	
Val Ala	Len Gl	u šla l	eu Thr	Wet A	sp Ala	Asp Ala	Asn 1	eu Asn	Asş
	978						685		
GIn Asp	Lea Le	u Pro A	lsp Asp	Val V	al Gla	Tyr Leu	Ass S	Ser Gla	Ass
1090			1095			1100			
Gla Thr	Gly Ty	x Gly (	iln 61a	Leu G	ln Ser	Gly Tle	Ser 0	an Asp	Sei
1105			10			1118		1	
Lys Val	Ala Hi	s Glu F	ro Glu	Asp L	ем Авр	Lan Ala	Gly L	eu Pro	Ass
		1125			1130			1135	
Sex His	Val Gi	y Gla 6	Hu Tyr	Pro A	la Leu	Glu Gln	Pro C	lys Ser	613
		.0			48		1.3		
Gly Ser	Lys Th	r Ásp l	.eu Pro	The G	la Trp	Asn Glu	Val S	er Ser	Gli
	185						165		
Thr Ser	Asp La	a Ser S	Ser Ser	Lys L	eu Lys	Cys Gly	Glu, G	Ha årg	Pre
1170			1175			1180			
Arg Gln	Gla Fr	o Arg G	lly Phe	Gly L	ev Tyr	Asn Asn	Met V	/al Val	His
1,135		-11	190		1	(195		]	200
Pro His	Ass Le	u Trp l	ys Val	Gly T	br Gly	Pro Ala	Giy 6	Hy Tyx	Sir
		1205			1210			1215	
Thr Leu	Gly Gi	u Asn S	Ser Ser	Thr T	yr Ása	Gly Pro	Glu B	lis Pho	Ala
	122	0		12	25		12	230	
He His	Ser GI	y Asp (	ily Leu	Gly T	br Asn	Gly Asn	The f	he His	Gle
1	239		1	240		1	248		
Gip Pro	Phe Ly	s thr f	ln Gln	Tyr G	ly Ser	Glm Leu	Asa A	irg Gln	Pro
1250			1255			1260			
Lin Thr	Ser Se				la Cyn	Gly Thr	Gly I	le Gin	Giy
1265		12	270		}	[278]		}	286
Ser Lye	Leu Ly	s Gly A	San Ser	Leu G	la Glu	Asn Gly	Gly I	æu Leu	Asy
		1285			1290			1295	
Phe Ber	Let Se	x Val /	lla Pro	Asa 6	lu Leu	Ala Gly	A39. I	dar Val	Ass
	130	0,		13	05		13	110	
Gly Mat.	Glo Th	r Gla 🕹	Asp Gla	Met G	ly Gla	Gly Tyr	He A	lla His	Gla
- 1	318		į	320		-	(328		
Leu Leu	Ser Gl	y Ser \$	let. Gln	His G	la Gly	Pro Ser	årg F	ro 61y	Gli
1330			1335			1340			
Gla Val	Leu Si	y Glu V	al Gly	Ala T	hr Ser	His Ile	Adm 3		
1348			350			1355			368
Gly Tha	Siu Se	r Cys I	en Pro	Cly T	hr Gla	Asp Asn	Ser S	Ser Gla	PER
		1368			1370			1378	
Ser Sex	Mat Al	a Ala l	le Arg			Pro Cys			Gij
	138				85			196	
Tin Som	A 8000 6 50	o Gla A	tio Hos	Pra A	re Gly	Sec. 1 633	Thy	40 G 8	5.38

1395 1400 1408

Gly Glm Leu Ser Asp Met Ser Glm Ser Ser Arg Val Asm Ser Ile Lys

```
Set Glu Ala Gln Gly Gln Ser Gln Gln Len Cys Ser Thr Val Gla Asm
                 1430
Tyr Ser Gly Gla Pha Tyr Asp Glo Thr Met Gly Phe Ser Glo Glo Asp
              1445
                                  1450
Arg Lys Ala Gly Ser Phe Sex Lou Ser Asp Ala Ash Cys Lew Lew Glo
          1460
                              1465
Gly Thr Cys Thr Glu Asn Ser Clu Leu Leu Ser Pro Gly Ala Asn Gla
                         1480
Val Thr Ser Thr Val Asp Ser Phe Glu Ser His Asp Leu Glu Gly Val
                      1495
                                         1800
Gin He Asp Phe Asp Ale He He Asp Asp Gly Asp His Thr Ser Leu
                                     1515
                  1510
Wet Sor Gly Ala Leu Ser Pro Ser He He Gla Asn Leu Ser His Ser
              1525
                                  1530
Ser Ser Arg Leu Thr Thr Pro Arg Ala Ser Leu Pro Phe Pro Ile Pro
          1540
                              1845
lie His Gly His His Gln His Gly Tyr Arg Gly Tyr Glu Phe Ala
                          1560
                                              1555
Asp Leo Pro Cyc Arg Arg Lys Gin Val Pro Cys Ser Tyr Ale Val Gly
                     1878
                                         1586
Gly Arg Gle Gly Gly Pro Gle Tur Gle Arg Leu Lys
                  1590
1389
<2105, 20
<211> S113
<212> 08A
<213> Mouse
<400> 20
anggeneric coannecaty converges according satisficat goodings 60
```

siagenegas tecsectsch seccescesse scassicisi ssattisssa cotsacasco 120 amageograp ggatteetti gagusacang etgangtum: gagungacat tatggaggee 180 casscerach guidange gaetgagagg angazagetg maanticent igggaantgi 240 occuegagas cagatguag egagaagger giggeeteta giaccactic caatgaggat 300 georgicity gacagabeta tescognyay agaagamang castesetat georgecticag 360 agigigeagg giotomesas anteagigas gagocologa estolagiga tgagagggor 420 tegergates agasagagat costggetel etachscale iggoggaged eteleteest 480 tacegtgggs engigtings entggateen eggaatgget anatggages teactaceas 540 correctoric trilicolige effectives estglacens ingatgeous scalestras 600 ggoogytacc stiatgaicc aistociatt setecatias argigestic igesitaist 660 agtageooga ogtatocaga cityecette attaggatet ceccaenoog fasteocact 720 gragoethag agtococcit cagencenna cancentaca teascocata tatggartac 780 alguyeicat igoacigoag occatoceto tecatgeto: otgrigoong agggotgago 840 coincegate eleccoated typasteage cotycegast actateacts gategoints 990 etgacaggeo agraçações itaigragas ateriteret cagetgecas tgriggigea 950 ggggreater atsiggegia estication siggicages oragalities espectass 1020 etgicageta ggeoragorg mammegiaca etgiceatat egeometyte agmicatage 1089 iteganette agacentgat aagaacatse estaneteet tggttacast ceteastaat 1140 tecogragea getetteage magiggitee tatgggenei tateggenag tgenoteage 1200 entgratiga gettraccia constenget entgigiete ticacatgea idaacagate 1260 ctasgeogae ageamagest aggeteeges inogganses geoeteetet esteeseeet 1320 gotocanost ticcamenca gagacerate cetgggatte egacagitet gaaceeegic 1980

enggionget etggecette tgagtertes ragageange ceasaagega gtetgeagtg 1440 ageageneig giggeceist gestnafang eggicesags temageeigs igaagseele 1500 cocaguecas gricacgass coagcassas cageessaas gaaraaccet asteassaa 1860 gangeggaca angalganag cangenggag cetgangten tetnegagae annetgeene 1620 tgggangget geaccagaga gitegacace casgateage tigigesica tatesatasi 1680 gacuncalte atggagadas gauggagtic gtgtgeeget ggettgaltg tillhegagag 1740 cagamacagt immagaces statisting startgests teagragace cactegogae 1860 asgectence antitacett typaggitge scammagect actemagnet cynamicety 1860 ammacconci tgagatotca cactggagag augucatacg tetgtgagen tgagagetge 1920 anceaggeth teletaetyn tinagalogg godaagdace assacagaad meattecaat 1980 gagaancegt atgiatgean aanocagge igeachinge gilmeneaga cereagetet 2040 eterggasae segigasgan tgigezigge entgasgete stgitaceas gasgessegt 2100 ggsgacatge accetegged tecoccoccy agagatteeg geagerath; acayteragg 2160 terretggee ggceauctes gggageatit ggtgageaga aggagetgag casesciaec 2220 tennagening augustivet changings actificance etgaganger animacatet 2280 cagenaagen eiggigytea gielinaige ageagecaae agteenceat cageasetat 2340 toccaraging georgaget feetergach galagangin signageaga coleaging 2400 atogatypas occusatest gysetegace at the acyg caseesinge cettyettiy 2400 cangecagga gaaabeegge agggaceasa tggatggage scateaaact tgaaaggeis 2520 asseangiga siggmatgui termagante assectatic tacceteras agreecines 2580 giatetecte feataggaas tggeseses teessisses setatagete gggtgggece 2640 ggganceire innegaging angigacets tenggigtag actioncapt getsmacura 2700 ctcascagga gagacagosa taccagoaci atengetety cetacetgag cagoogcaga 2760 tectoggges teterecets citticesen egesketens sugaggeste consucasas 2820 gggogaccoc agaatgtgag tgtggctgac tectacgate contclocac agatgettes 2880 aggaggicca gegaggecag ceagggigae gggeigeces giotgeleag ceicacaece 2940 gtgeageagt aegenetias ggecaagtat geageteega caggtggee aecanneaca 3000 actotycoca scalgysgag gotyngeaty magacranga tygoottyot aggygnyggy 2060 agggartety gggigacert gentecagte natentecto gaagalgnag fgatggggga 3120 gytemescat scapsyggry temestysty reteatysty esclasegus costytysyg 2186 agasacases accetstras gamasteins sasaaratsi nacitsebas ssiteaanse 2240 ticagoagoo icasiagett tastectees saittgeete esteggiggs sasgegiage 3300 ttagtgeige assattatae coggenggag agengeenne coeggtacit conggentee 3360 cettgeccie ceageateae agagaatgie geeetggagg eletgaceat ggatgetgat 3420 enteantiga signigases colorigora gaigatgigg tacaginiti sastinocas 3480 nancamadas gytatussus scaptiscas astesdatet eignasmuas canastasce 3540 catgagacag aggaritgga ettagesggg etgecagaes gicatgitigs craggagian 2600 conscious agengoeis etelengue aginamets attiqueent consugnad 3660 gaggioagti eigganette igaisigica testeraage igaagigigg isageagryc 3720 octaggeage agestegggg tittigggeta tamascaata iggiggtaes cecaesiasi 3780 ctgtggaagg tiggcactgg occagetggg ggatascaga cociegggga gaatagsagt 3840 accineasig generages cittgraste caestiggs siggactigs canasigss 3900 animetrico nigamengos cittangues cagengtaty gengeraget canonggong 3960 ccaetgacti ccaetgeint agsteatgee tguggtacag ggatteaagg giccaageta 4020 asaggeanca getigeanga gautgggggi itgelagait teageeigte egtggeacea 4080 antgagitag otggranear agiganiggo atgenaseer angatemusi gagaraggga 4140 iscatigocc atcagntaci cagiggoago aigeaanace agggeceeag engecetggt 4200 cascaggiac tagggeagg: iggigetain teacsiates acaictates agggacagag 4260 ageigeciae caggmeica gyacaacage agecagerat caagratgge agetateagg 4220 geotaccase congresses chargeget accargoste aggraaters accargoranc 4380

ctesetetge ameangers geteagtes atgastess graseaggt gaseagete 4440
ammatggagg encanggtes greengesg etetgetets controlled that terminate accounted greeters careagase granageing eteritore 4560
ctotengats consected geteenange aratecats amaseters granageing eteritore 4620
congrigers accangtant magement garagette agasteries etermange 4480
greetingse cannotate tempered accorded eatterness 4740
greetingse cannotate tempered tempered eaterness 4880
congressione tempered accorded eatgranes eterminate eterminate encettings agasters tempered eaterness 4880
talgaginet ingelgate eccityons agasagens theoretical talgages 4880
tetilianger etgistest titagense tempered agasters tempered tempered eaterness 5040
tetterness traingens gracters magerians grattering granamics 5040
tetterness eag

```
<210> 21
(211) 1596
<2152 bkt
(213) Hussan
⟨400⟩ 21
Not Giu Ala Giu Sor His Ser Ser Thr Thr Thr Giu Lys Lys Val
                                  10
1
                5
Giu Asn Ser He Val Lys Cys Ser Thr Arg Thr Asp Val Ser Glu Lys
                              28
Ale Val Ala Ser Ser Thr Thr Ser Asa Giu Asp Glu Ser Pro Gly Gla
                          40
Thr Tyr His Arg Glu Arg Arg Asa Ale He Thr Net Glu Pro Glu Asa
                     - 55
Val Gin Gly Leu Ser Lys Val Ser Glu Glu Pro Ser Thr Ser Ser Asp
                             79
                 70
Giu Arg Als Ser Leu He Lys Lys Ghu He His Gly Ser Leu Pro His
                                 90
Val Ala Glu Pro Ser Val Pro Tyr Arg Gly The Val Phe Ale Bet Asp
                                             110
                            105
Pro Ary Asa Gly Tyr Net Glu Pro His Tyr His Pro Pro His Leu Phe
                          129
       115
Pro Ala Phe His Pro Pro Val Pro Lie Asp Ala Arg His His Gla Gly
           135
```

 145
 150
 155
 160

 Alis Leu Ser Ser Ser Pro Thr Tyr Pro Asp Leu Pro Phe IIe Arg IIe
 165
 170
 175

 Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Ala Ala Ser Giu Ser Pro Phe Ser Pro 180
 185
 190

 Pro His Pro Tyr IIe Asp Pro Tyr Met Asp Tyr IIe Arg Sur Leu His
 196
 200

 Ser Ser Pro Ser Leu Ser Mat IIe Ser Ala Thr Arg Giv Leu Ser Pro

Arg Tyr His Tyr Asp Pro Ser Pro Lie Pro Pro Lou His Met Thr Ser

Ser Ser Pro Ser Lem Ser Met IIe Ser Ale Thr Arg Gly Lem Ser Pro 210 215 220

The Asp Als Pro Nie Ala Gly Val Ser Pro Ala Glu Tyr Tyr Nie Glu 225 230 235 240

Met.	Ala	Lou	Len	Thr 245	Gly	Gla	Arg	Sex	Pro 250	Tyr	Ala	Asp	He	lle. 255	Pro
Sec	Ala	Ala	The 260	Ala	Gly:	Thr	Gly	Ala 265	Ne	His	Met	Glu	Tyr 270	Leu	His
Alą	Met	Åsp 275	Ser	Thr	Arg	Phe	Ser 280	Ser	Pro	Árg	Leu	Sex 288	Ala	Arg	Fro
	års 290	Lys	Arg	Thr	Leu	Ser 295	He	Ser	Pro		Sex 360	dap	His	Ser	Phe
		Gin	Thr	Met	He 310	Arg	Thr:	Sex	Pro	Asn 315	Ser	Len	Yal		lle 320
	Áan	Asu	Ser	Arg 325			Sex	Sex	Ala 330		G} y	Ser	Tyr		
Lega,	Ser	Ala	Ser 340		Ile:	Sex	Pro	Ala 348		Ser	Phe	Thr	Tyr 350		Sex
Ala	Pro	Val		Leu	His	%e¢	His 360		Ğla	He	Leu	Sex		6lu	űlű
Ser		386 Gly	Ser	Ala	Phe	Gly 375		Ser	Pro	Pro	Leu 380		His	Pro	Ala
Pro	370 Thr	Phy	Pro	Thr	Ğln		Pro	He	Pro.	GLy		Per	Thr	Val	Leu
385					390					395					400
Asn	Pro	Va).	Gla		Ser	Ser	Gly					Ser	Gin		Lys
Sair	35	Ser	r.l.s	465 Sev	17.5	Ver F	See			Ole.		Pen	Store	415	Ach
5 . <b>t</b> to	1333	2862	420	Gr.	249 60	14.3	ere i	425	13.5	9,03	carage	C 3102	430	31313	,,,,,
Lys	Ārg	Sex 436	Lys	Me	Lys	Pro	Asp 440		Asp	Leu	Pro	Sex 445	Pro	Gly	Ala
Arg	Giy 450	Gla	Gla	Glu	Gln	Pro 455	Glu	Gly	Thr	Thr	Leu 460	Val	Lys	Ola:	Glu
61y 465		Lys	Asp	Glų	Sex 470	Lys	Gla	Glu	Pro	Glu 475	Val	He	Tyr	Glu	Thx 480
Åsn	Суя	llis		Giu 485	G] y	Cys	Als	Årg	Glu 490	Phe	Азр	Tim	Sin	61a 498	G}s
Leu	¥s i	His	8is 600		Åsu			His SOS			Gly		Lys 510	Lys	G) u
Phe	Va.l	Cys 515	Arg	Trp	Lett	Asp	Cys 520	Ser	Ang	Glu	Ğİn	Lys 525	Fro	Phe	Lys
Alis	61n 530	Tyr	Met	bes	Val	Val. 535	His	Net	Arg	Årg	Hi.a 540	The	Gly.	Glu	Lys
Proj	His	Lys	Сук	Thr	Phe	613	Gly	Cys	Thr		Ala	Tyr	Ser	Arg	Leu
545					850		:		h=7 h	\$55	9.4.5	0.1	,	**	580
		Ľeu		569					570					575	
Val	Cys	Giu	llis 580	Glu	6ly	Cys	åsn	Lys 585	Ala	Phe	Ser	Asn	Ala 590	Ser	Åsp
Arg	Ala	Lys 698	His	Gln	åss		Thr 600	Bis	Ser	Àsn	Glu	Lys 605	Pro	lyr	Val
Cys	Lys 610	He	Pro	Gly	Cys.			Arg	Tyr	Thr	Asp 620	Pro	Ser	Ser	Leu

		128													
Àrg	Lys	His	Va E	Lys	Ter	Val	His	Gly	pro	Glu	Ala	His	Yal	Thr	Lys
628					630					835					640
Lys	Gla	Ang	Gly	Asp	11:3	His	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Asp	Ser
				848					650					655	
Gly.	Sex	His	Sec	(i)n	Ser	Årg	Ser	Pro	Gly	Arg	Pro	Thr	Gla	Ġ) y	Ala
			660					665					670		
Len.	Gly	Gla	G].u	$GL\alpha_i$	ásp	Leu	Sex	Am	Ther	Thr	Ser	Lys	årg	Giu	Glu
		875					680					885			
Cys	Leu	9la	Val	Lys	Thr	Val	Lys	Ala	Glu	Lys	61.0	Set	The	Sec	Gla
	690					698					700				
Pro	Sex	$p_{ro}$	Gly	Gly	Gla	Ser	Sec	Cys	Sex	Ser	Gln	Gin	Ser	820	He
705					710					715					720
Sex	Assi	Tyr	Ser	Asm	Ser	Gly	Leu	Ğbu	Leu	Pro	Len	Thr	Asp	Gly	Gly
				725					730					738	
Sex	De	Gly	Asp	Leu	Ser	833	He	Asp	Glu	Thr	Pro	$\Pi e$	Met	Asp	Sex
			740					748					750		
Thr	ne	Ser	The	Ala	Thr	Thr	Ala	Len	Ala	Lett	aln	Ala	årg	Arg	Asn
		788					760					765			
Pro	Ala	Gly	The	Lys	Tep	Met	$@]_{\mathfrak{Q}}$	His	Val	Lys	Leg	Ghi	årg	1.693	Lys
	770					778					780				
Gh	$v_{B}$	Ass	Gly	Met	Phe	Pro	árg.	Leu	Asn	Pro	He	Leo	Pro	Pro	Lys
785					790					795					800
Ala	Pro	Ala	Val	See	$p_{TO}$	Less	He	Gly	Asti	Gly	Thr	Gin	Ser	åsa	Asn
				805					810					815	
Tim	Cys	Ser	Leo	Siy	Gly	${\rm Pro}$	Met	Thr	Leu	Leu	$bx\phi$	Gly	Ang	Ser	Acp
			820					325					830		
(.60	Ser	Gly	V3 {	Авр	Val	Thr	Mei	Leu	åsn	Met	Leu	Am	Arg	arg.	Asp
		835					840					845			
Ser	Ser	Ala	$S_{\mathfrak{M}\Sigma}$	Thr	110	Ser	Ser	Ala	Tyx	Leu	Ser	Sex	Arg	Arg	Ser
	850					855					890				
Sex	Siy	He	Sex	Fro	Cys	Pac	Ser	Ser	Ang	Arg	Ser	Ser	<u>63</u> 8	Ala	Ser
865					870					875					880
Gin	A) a	Glu	€{ÿ	árg	Pro	Ein	àsb	Vai	Ser	Ya!	Ala	Asp	Ser		Asp
				885					896					895	
Pro	lle	Sec	Ter	Asp	Ala	Ser	Arg		Sex	Ser	Glu	Ala	Sex	Gln	Ser
			900					995					910		
åsp	Gly	Leu	Pro	Ser	Len	Lea	See	Leu	Tim	Pro	Ala		6)11	Tyr	Arg
		915					920					925			
Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Ala	Als	Ala	Thr	GLy	61 y		Pro	Pro	Dar	Pxo
	930					935					949.				
Leu	Pro	Aun	Met	Glu		398	Ser	Leu	Lys		Arg	Leu	Ala	Leg	
945					950				,	-955 '-	<u>.</u>				360
Gly	Asp	Ala	Let		Pro	ΘΆ	Val	Ala		Pro	Pro	¥3.]	His		Ero
				965					970					975	
Ars	Arg	Cys	Sex	Asp	GLy	617	Åla		Gl.y	Lát	Gly	Arg		His	£.833
			980				1.	985					990	1	
GIn'	Bro	His	Asig	Als	Leu			Gly	Val	Arg			Ser	Asp	37.50
		995					000					1005			
Val	Arg	Thr	$G_{1,y}$	Ser	Bu	Gly	læu	Ala	i.eu	Pro	Arg	Val	Pro	Arg	Phe

1010	101	ș.	1920	
Ser Ser Leu Sex			a Met Ala Thr	Ser Ala Glu
1025	1030		1035	1049
Lys Arg Ser Len	Val Leu Gl	a Asa Tyr Th	c Arg Pro-Glu	Gly Gly Gln
	1045	105	0	1065
Ser Arg Asn Phe	His Ser Se	r Pro Cys Pr	o Pro Ser Tie	The Glu Ass
1066		1065		1070.
Val Tar Leu Glu	Ser Leu Th			
1075		1080	1085	
Glu Asp Phe Leu				Ser Gin Asn
1090	109		1100	
Gla Ala Gly Tyx				
1105	1119			1120
Lys Val Pro Mis				
	1125	113		1135
Ser His Ala Gly				
1140		1145 - 11. cm to		1150 Can Can Div
Gly Ser Lys Thr	ash rea in	o me om m 1160		
Sér Ala Asp Leu	Case Case Ca			
1170	ORL ON SE		1180	mg can and
Val Pro Gla Thr				Val Val His
	1190		. 1198	1200
Pro Gin Aon Pro				
	1205	121		1218
We Ola Sen Bor	Asp Pro Tr			
Gly Glu Asn Ser 1228				1230
1220		1225		
1220 Asm Ser Pro Gly	Ser Gly Th	1225 r Ser Gly As	n Ala Phe Bis	Glu Glin Pro
1220 Asm Ser Pro Sly 1235	Sex Gly Th	1225 r Ser Gly As 1240	n Ala Phe Bis 1245	Giu Gin Pro
1220 Asm Ser Pro Gly	Ser Gly To	1225 r Ser Gly As 1240	n Ala Phe Bis 1245 u Asn Arg Gin	Giu Gin Pro
1220 Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250	Ser Gly Th Gin Tyr Gl 125	1225 r Ser Gly As 1240 y Asn Cys Le S	n Ala Phe Bis 1245 u Asa Arg Gia 1260	Giu Gin Pro Pro Vai Ala
1220 Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro	Ser Gly Th Gin Tyr Gl 125 Asp Gly Al	1225 r Ser Gly As 1240 y Asn Cys Le S	n Ala Phe Bis 1245 u Asa Arg Gia 1260	Giu Gin Pro Pro Vai Ala
1220 Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu	Ser Gly Th Gin Tyr Gl 125 Asp Gly Al 1276	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cya Le S a Cya Gly Al	n Ala Phe Bis 1245 u Aso Arg Gio 1260 a Gly Ile Gio 1275	Giu Gin Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280
1220 Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu 1265	Ser Gly Th Gin Tyr Gl 125 Asp Gly Al 1276	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cya Le S a Cya Gly Al	n Ala Phe Bis 1245 u Aso Ary Gio 1260 a Gly Ile Gio 1275 y Gly Gio Leo	Giu Gin Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280
1220 Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu 1265	Ser Gly Th Gin Tyr Gl 125 Asp Gly Al 1270 Pro Met Gl	1225 r Ser Gly As 1240 y Asn Cys Le 8 s Cys Gly Al n Gly Ser Gl	n Ala Phe Bis 1245 u Asa Arg Gia 1260 a Gly He Gia 1275 y Gly Gla Lau 0	Giu Gin Pro Pro Vai Ala Ala Ser Lys 1280 Ann Phe Gly 1295
Asn Ser Pro Gly 1235 Cye Lye Ala Pro 1250 Pro Gly Ala Leu 1265 Leu Lys Ser Thr	Ser Gly Th Gin Tyr Gl 125 Asp Gly Al 1276 Pro Met Gl (285 Pro Asn Gl	1225 r Ser Gly As 1240 y Asn Cys Le 8 s Cys Gly Al n Gly Ser Gl	n Ala Phe Bis 1245 u Asa Arg Gia 1260 a Gly He Gia 1275 y Gly Gla Lau 0	Giu Gin Pro Pro Vai Ala Ala Ser Lys 1280 Ann Phe Gly 1295
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu 1265 Leu Lys Sex Thr	Ser Gly Th Gin Tyr Gl 125 Asp Gly Al 1270 Pro Met Gl (285 Pro Asn Gl	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cys Le 5 s Cys Gly Al a Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl	n Ala Phe Bis 1245 u Ase Ary Gin 1260 a Gly Ile Gin 1275 y Gly Gin Leu O y Ser Met Val	Ghu Ghn Pro Pro Vai Ala Ala Ser Lys 1280 Asm Phe Gly 1295 Asm Gly Mer 1310
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu 1265 Leu Lys Ser Thr Leu Pro Val Ala 1200	Ser Gly Th Gin Tyr Gl 125 Asp Gly Al 1270 Pro Met Gl (285 Pro Asn Gl	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cys Le 5 s Cys Gly Al a Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl	n Ala Phe Bis 1245 u Ase Ary Gin 1260 a Gly Ile Gin 1275 y Gly Gin Leu O y Ser Met Val	Glu Gli Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280 Ann Phe Gly 1295 Ann Gly Mei 1310 Gla Leu Leu
Asm Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Ala Leu 1265 Leu Lys Sex Thr Leu Fro Val Ala 1300 Gla Asa Gla Asa	Ser Gly Th  Gin Tyr Gl  125 Asp Gly Al  1276 Pro Met Gl  1285 Pro Asn Gl  Pro Val Gl	1225 r Ser Gly As 1240 y Aso Cyo Le S s Cys Gly Al n Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl 1305 y Glo Gly Ty	n Ala Phe Bis 1245 u Asn Arg Gin 1260 a Gly Ile Gin 1275 y Gly Gin Leu O y Ser Met Vel r Leu Ala His	Glu Glu Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280 Asm Phe Gly 1295 Asm Gly Mex 1310 Glu Leu Leu
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu 1265 Leu Lys Ser Thr Leu Pro Val Ala 1200 Gla Asn Gla Asp 1215 Cly Asp Ser Met	Ser Gly Th  Gin Tyr Gl  125 Asp Gly Al  1270 Pro Met Gl  (285 Pro Asn Gl  Pro Val Gl  Gin His Fr  133	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cys Le 5 s Cys Gly Al a Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl 1305 y Gla Gly Ty 1320 o Gly Ala Gl 5	n Ala Phe Bis 1245 u Ase Arg Gin 1260 a Gly 11c Gin 1275 y Gly Gin Leu 0 y Ser Met Val r Leu Ala Mis 1325 y Arg Pro Giy	Glu Gln Pro Pro Vai Ala Ala Ser Lys 1280 Asm Phe Gly 1295 Asm Gly Mer 1310 Gln Leu Leu Gln Gln Set
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Ais Leu 1265 Leu Lys Sex Thr Leu Pro Val Ala 1300 Gln Asn Gln Asp 1215 Gly Asp Sex Met	Ser Gly Th  Gin Tyr Gl  125 Asp Gly Al  1270 Pro Met Gl  (285 Pro Asn Gl  Pro Val Gl  Gin His Fr  133	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cys Le 5 s Cys Gly Al a Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl 1305 y Gla Gly Ty 1320 o Gly Ala Gl 5	n Ala Phe Bis 1245 u Asn Arg Gin 1260 a Gly lle Gin 1275 y Gly Gin Lau 0 y Sar Met Val r Leu Ala Mis 1325 y Arg Pro Gly 1340 e Asn Ile Tyr	Glu Gln Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280 Ann Phe Gly 1295 Ash Gly Mer 1310 Gla Leu Leu Gln Gln Met
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu 1265 Leu Lys Ser Thr Leu Pro Val Ala 1200 Gla Asn Gla Asp 1215 Cly Asp Ser Met	Ser Gly Th  Gin Tyr Gl  125 Asp Gly Al  1270 Pro Met Gl  (285 Pro Asn Gl  Pro Val Gl  Gin His Fr  133	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cys Le 5 s Cys Gly Al a Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl 1305 y Gla Gly Ty 1320 o Gly Ala Gl 5	n Ala Phe Bis 1245 u Ase Arg Gin 1260 a Gly 11c Gin 1275 y Gly Gin Leu 0 y Ser Met Val r Leu Ala Mis 1325 y Arg Pro Giy	Glu Gln Pro Pro Vai Ala Ala Ser Lys 1280 Asm Phe Gly 1295 Asm Gly Mer 1310 Gln Leu Leu Gln Gln Set
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu 1265 Leu Lys Sex Thr Leu Pro Val Ala 1300 Gln Asn Gln Asp 1215 Gly Asp Sex Met 1330 Leu Gly Gln He 1345	Ser Gly Th  Gin Tyr Gl  125 Asp Gly Al  1276 Pro Met Gl  (285 Pro Asn Gl  Pro Val Gl  Gin Ris Pr  133 Ser Ala Th  1350	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cys Le S a Cys Gly Al a Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl 1305 y Gla Gly Ty (320 a Gly Ala Gl 5 r Ser Nis Il	n Ala Phe Bis 1245 u Asn Arg Gin 1260 a Gly Ile Gin 1275 y Gly Gin Leu 0 y Ser Met Val r Leu Ala Mic 1325 y Arg Pro Gly 1340 e Asn Ile Tyr	Glu Gln Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280 Ann Phe Gly 1295 Ash Gly Mer 1310 Gln Leu Leu Gln Gln Met
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu 1265 Leu Lys Sex Thr Leu Pro Val Ala 1300 Gln Asn Gln Asp 1215 Gly Asp Sex Met 1330 Leu Gly Gln Ils	Ser Gly Th  Gin Tyr Gl 125 Asp Gly Al 1270 Pro Met Gl (285 Pro Asn Gl Pro Val Gl Gin His Pr 133 Ser Ala Th 1350 Pro Gly Al	1225 r Ser Gly As 1240 y Asn Cys Le 5 s Cys Gly Al n Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl 1305 y Gln Gly Ty (320 n Gly Ala Gl 5 r Ser His II	n Ala Phe Bis 1245 u Asn Arg Gin 1260 a Gly ile Gin 1275 y Gly Gin Les 0 y Ser Met Val r Leu Ala His 1325 y Arg Pro Giy 1340 e Asn Ile Tyr 1355	Glu Gln Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280 Asm Phe Gly 1295 Asm Gly Mer 1310 Gln Leu Leu Gln Gln Set Gln Gly Pro 1360 Pro Ser Ser
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Aia Pro 1250 Pro Gly Ais Leu 1265 Leu Lys Ser Thr Leu Pro Val Ala 1300 Gla Asn Gla Asp 1215 Gly Asp Ser Met 1330 Leu Gly Gla Fle 1345 Glu Ser Cys Leu	Ser Gly Th  Gin Tyr Gl 125 Asp Gly Al 1270 Pro Met Gl (285 Pro Asn Gl Pro Val Gl Gin His Pr 133 Ser Ala Th 1350 Pro Gly Al 1365	1225 r Ser Gly As 1240 y Asn Cys Le 5 s Cys Gly Al n Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl 1305 y Gln Gly Ty (320 n Gly Ala Gl 5 r Ser His H a His Gly Me	n Ala Phe Bis 1245 u Asn Arg Gin 1260 a Gly ile Gin 1275 y Gly Gin Les 0 y Ser Met Val r Leu Ala His 1325 y Arg Pro Giy 1340 e Asn Ile Tyr 1355 t Gly Ser Gin	Glu Gln Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280 Asm Phe Gly 1295 Asm Cly Mer 1310 Gln Leu Leu Gln Gln Set Gln Gly Pro 1360 Pro Ser Ser 1375
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Ala Pro 1250 Pro Gly Als Leu 1265 Leu Lys Ser Thr Leu Pro Val Ala 1300 Gln Asn Gln Asp 1215 Gly Asp Sex Met 1330 Leu Gly Glo Ils 1345 Glu Ser Cys Leu Leu Ala Val Val	Ser Gly Th  Gin Tyr Gl  125  Asp Gly Al  1276  Pro Met Gl  (285  Pro Asn Gl  Pro Val Gl  Gin Ris Pr  133  Ser Ala Th  1350  Pro Gly Al  1365  Atg Gly Ty	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cys Le S s Cys Gly Al a Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl 1305 y Gla Gly Ty (320 o Gly Ala Gl 5 r Ser Nis Il a Nis Gly Me 137 r Gla Pro Cy	n Ala Phe Bis 1245 u Asn Arg Gin 1260 a Gly ile Gin 1275 y Gly Gin Les 0 y Ser Met Val r Leu Ala His 1325 y Arg Pro Giy 1340 e Asn Ile Tyr 1355 t Gly Ser Gin	Glu Gln Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280 Asm Phe Gly 1295 Asm Gly Mer 1310 Gln Leu Leu Gln Gln Met Gln Gly Pro 1360 Pro Ser Ser 1375 Gly Gly Ser
Asn Ser Pro Gly 1235 Cys Lys Aia Pro 1250 Pro Gly Ais Leu 1265 Leu Lys Ser Thr Leu Pro Val Ala 1300 Gla Asn Gla Asp 1215 Gly Asp Ser Met 1330 Leu Gly Gla Fle 1345 Glu Ser Cys Leu	Ser Gly Th  Gin Tyr Gl  125  Asp Gly Al  1270  Pro Met Gl  (285  Pro Asn Gl  Pro Val Gl  Gin Mis Pr  133  Ser Ala Th  1350  Pro Gly Al  1365  Arg Gly Ty	1225 r Ser Gly As 1240 y Asa Cys Le 5 a Cys Gly Al a Gly Ser Gl 129 u Ser Ala Gl 1305 y Gla Gly Ty 1320 o Gly Ala Gl 5 r Ser Nis Il a Nis Gly Me 137 r Gla Pro Cy 1385	n Ala Phe Bis 1245 u Asn Arg Gin 1260 a Gly Ile Gin 1275 y Gly Glo Len 0 y Ser Met Val r Leu Ala Mic 1325 y Arg Pro Gly 1340 e Asn Ile Tyr 1355 t Gly Ser Gln 0 s Ala Ser Phe	Glu Gln Pro Pro Val Ala Ala Ser Lys 1280 Asm Phe Gly 1295 Asm Cly Mer 1310 Gla Leu Leu Gln Gln Set Gln Gly Pro 1360 Pro Ser Ser 1375 Gly Gly Ser

127

1405 1406

1395 Lew Ser Asp Thr Ser Gin Thr Cyc Arg Val Asn Gly Ile Lys Wet Gin 1420 1415 Met Lys Gly Gla Pro His Pro Leu Cys Ser Am Leu Gla Asa Tyr Ser 1430 1435 1425

Gly Gin Pho Tyr Asp Gin Thr Val Gly Pho Ser Gin Gin Asp Thr Lys 1456

Ala Gly Ser Phe Ser Ile Ser Asp Ala Ser Cys Leu Leu Gln Gly Thr 1480 1465 1470

Ser Ala Lya Asn Ser Glu Leu Leu Ser Pro Gly Ala Asn Gln Val Tur 1489 1498

Ser Thr Val Asp Ser Len Asp Ser His Asp Leg Giu Gly Val Gla His 1495

Asp Phe Asp Ala Ile Ile Asp Asp Gly Asp His Ser Ser Leu Wet Ser 1510 1515

Gly Ala Lea Ser Pro Ser He He Gln Asn Lou Ser His Ser Ser Ser 1838 1825 1630

Arg Leu Thr Thr Pro Arg Ala Ser Leu Pro Phe Pro Val Ala Val His 1545

Glu His His Glo His Gly Tyr Arg Gly His Glu Phe Phe Ala Asp Lou 1560

Pro Ser Gly Arg Lys Gla He Pro Cys Ser Tyr Ala He Gly Phe Arg 1575 1580

Lys Lys Arg Lew Glu Pro Thr Glu Ile Asm Arg Ser 1990 1590 1585

C216> 22

(211) 5055

<212> D8A

(213) Human

₹406> 22

egatoctacy tyggositit tygteyanga gagetgaayt aatgagasga esteatgyag 60 seccestees acaseteese gaccacigaa aagaamaas tigagaatto catagigaag 120 typicemete gaacagaigt gagogagasa geogrificet coagcarcae ticlastgag iso gatganagio otgganagan tiatonoaga gagagaagan angonathan tatgoagona 240 engaatgtee nggggeteag eausgteagt gaggaacett cameategag tgaegagagg 300 gootcatiga teaagamaga garmesiggy invelgeese acytygygys grecintyig 368 cogtacogog spacegigit tgccategac codageaate gitacatega socccactad 420 capociosto stotiticos tigostecat estocigias caatigaigo cagacateat 480 gagggeegtt accettacga tecatoleeg attociossi tgeatatgac thocgootta 540 teragragno eracgiatos gysectiose treatlagga tetericada ecquasecce 600 getgetgett cegagietee etteagoeel ceacatecet acatisates classiggse 600 catalogget cettgracag cagoccateg etcloratga teleaguac regigggetg 726 agneriacas atseseccea tseassaste ascecasoas sainciates teasatssee 780 eigetemetg gecagegeag ceretaigea gacattatic ecleagetge cacegoogge 840 acgggggcca tecacatgga sinfetirat getaiggata genecagati etecageere 900 aggetginag enaggengag negamanyt anantgtona tatraccant etcogatoai 950 agettigace ticagaccai galaaggaeg intoccasel eetiggicae gaticicaat 1929 saffecegts gragefette ageasgigge testarggte seliatelise eastgesate 1080 agreetgeet tgagettese ctactettee gegeeegtei richeesest gestesgesg 1140

```
stoctaagee gacascagag ettaggitea gecittggae acageeetee acteateese 1200
cotgococas ettitecase adagaggeet attoraggga tecotacggt totgaseece 1260
gtecasgica gelecogoco itolgagico teacagaach ascocacgag igagicigea 1520
gigagnagea ciggigaeco gaigeacase asgaggiera agaicasaec ogaigaagan 1580.
riccerages caggageing ggageagnag gaanageneg aaggaanaan notigicaas 1445
goggaagggg meaangatga sagchamnag gageetgaag teatetatga gacaaactge 1600
cactyggasg gotgogogag ggagttogac acceasyage agettytges costatasat 1580
azegnecata ticatggaga gangaaygag ticgigigda ggiggotgga cigotcaaga 1620
gagongahan cotteaange conglatain tiggingine ainigagang scacaegage 1580
gagaageete acasargese tittganggi tgearmaagg cetaclegag actagaaasac 1740
itgaamean actigagate teacactgga gagaaaceat acgtelgtga geacgaaggt 1800
igonarmage etticicama igocicigat ogogocame accamamaga macgestice 1890
actgagnaac catatgtgtg cassatores ggotgeacts agogttacac agaccosage 1920
toccteegga ascatgigam garagignat gacceagagg cidatgidac maagangong 1987
cgaggggaca iccatocteg geogecacce cogagagati coggcagosa ticaeagtes 2040
aggiogeoig geogaeogae tengagagoe etiggigage ageaggaeet cagesacaet 2100
accinadage gagaagaatg cetecaggig anaaecgica aggragagaa gecaalgaca 2150
teresgeess greetgyigg tesgicties igesgesgee sacagiere catesgesse 2220
tattomaca gigggetega gettecteig accentegas gtagtatagg agacettagt 2280
gocalogaty seercoeset catygactos accetticos ofgeserose secretigot 2340
tigeaageea ggagamacer ggeagggace maniggaigg agemegiama meingamagg 2400
ciannecase iganiggani gritocycga etganeccca ticiaccece inangecent 2460
geggteiste eteteatagg aastigensa engterasea meacetgeag etteggtegg 2520
constgango itotoenggg nagaagegan etototogggg tegangtoan tatgoigaan 2580
atgoteames gangggiong engagemenge incontenger eggentaert gagengee 2640
egetecteng ggateleger etgetteter ngroycogel congegagge gtenengger 2700
gagggoogge egoagaacgt gagogtggot gartoeineg necesatete cardgarget 2760
togogooget coagogooge caseengage ganggootge enagontget caseettang 2820
coegercage aglacognet cassgressay langesgots coscassags secresces 2860.
angininigi ocasesigga gaggaigago otgosgango poetgyogoi gologgggat 2940
goodlogage etggogigge entgeotoes giteatgone egaggaggig cagegaegsg 3000
ggageceneg gelacggges gegocaretg engergeacg nigegeiggs scarggogis 3660
aggaggacea gegacceggi geggacagge icegaggger igsceetsee icgistsees 3120
egetteages geotesgesg etgesséese coggegatgg coacgteege gysgasgege 3180
agtorogigo ilcagastia caegoggeos gagggeggeo agreecgasa citecasteg 3240
tecceptate eteccasest cacegagase stracetas astecetase catagasses. 3300
gatguenace tgaacgaiga ggatticerg congacgaeg iggignagia titasattee 3360
cagamicang cannytacya gragoactic coengegore treeggacya cagramanty 3420
coccanggge orgatigantt isangespece gagetigerag adagerange tagringarag 3480
thesatgees tegageages capaceagag ggouscausa esgaceages cattenging 3540
angeantes getengang excepancty technique agotesagig (288608788 3830
erogoistge eyeoguetes escettings theirmann grategiest coaccepting 3680
ancrecitya gwagosageo igotggggge tatcagacco toggggagaa cageuaccoc 3720
tudggigged cagagemett gatgeteese ascagecery gaagtggene cagtggmase 3786
gosticents amengenety thankscopic castategen activities caggragees 3840
gtggoodetg gtgcactoga oggigodigt ggtgooggge ttemagecto amegelgmag 3906
ageacneeca tgcaagggag egggggeeag etgaaliteg geetgeeggt agegeeaaat 3966
gaginagety gragosigst gastgyratg cagaaccags accountegs scaggestar 4020
ciggoicace ageiceiegg egacagentg cageaceegg gggcaggeeg eccegging 4080
capatgette accapating igniserios encatesses telsecasee ecases and 40
```

```
tgactgoong gagetenegg catgageage capecgions gettageagt tgtcagage 4200
taccagocat gigocagoti igggggcago aggogcoagg ciaigcogag ggacagooti 4260
geletgeagt cassacaget caglgacaca agteaganet scaggstgaa testateaas 4820
stggagaiga sagggeagee ceateogerg tgetetaste tgeagastia etetggicag 4380
ticintgace manacegiggy effengtons cangacanga angeiggtic attriciati 4440
teagangena getgeetget anaggggact agogecaass actolyagut actitecens 4500
ggigotaato aggigacaag capagiygac agortegaca gocatgacei agaagggata 4580
cagatigact tegatgeest catagatgat agggaceset coagocigat gtogasaggee 4620
etgagecesa gialcatica gasectited catagetect occapocicae caegocicas 4680
gostecetee estichessi vsetstocat sascaceace aacatssets tessssacet 4740
gagtteiltg etgaestece tageggaaga aagesaatte ettgeagita igeaalagge 4800
tilaggaana saagaciges seemacggas siesslagga gitgasgaga tissacigse 4960
trigitings eigitifitt agticigiat gratitinge autocenter excetaecte 4920
agaigigiff canttaintt cettitaigg managenete igamammere teanginite 4980
ragggagasa digieticca fiteagitti gaairagiat igitacacte asaccaccet 5040
ctttitasaa asaaa
                                                                  5055
```

## 【関係の簡単な説明】

\* 列を示す図である。

【図1】 一文字表記によるマウスG 1 i 1のアミノ酸配\*

## [21]

THE RESIDENCE AND THE RESIDENCE PROPERTY OF 
7	Ħ		300	ジの続き
---	---	--	-----	------

(51).Int.C1.		識別能券	<b>E</b> 1		デーツコード (参考)
ABIP	19/00		A 6 1 P	19/02	40088
	19/02			19/08	4H045
	19/08			19/10	
	19/10			43/00	1.0-5
	43/00	1.05	C12Q	1/92	
C12N	5/06			1/68	.A
	15/09	ZNA	GOIN	33/15	$\mathbf{Z}_{i}$
C 1 2 Q	1/62			33/50	Z
	1/68			83/53	Ð
GOIN	33/15				M
	33/50			33/566	

33/83

CO7K 14/47 A61K 37/62

33/866

C12N 15/00 S/00 ZNAA E

// CO7K 14/47

アターム(参考) 20045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36

PB02 PB03

4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09

CAZO DAGO DAGO BAGA FAGO

PAGG GAIS GAIS HAIL HAIS

HA17

48063 QAG1 QAG5 QA13 QA17 QA19

QQ08 QQZ1 QQ41 QQ43 QQ53

QQ61 QQ89 Q898 Q832 Q835

QR40 QR42 QR56 QR62 QR77

QR80 QS16 QS26 QS34 QX02

48065 AASIX AASIY AASIX AASIY

AB01 AC14 AC20 BA02 CA24

CA43 CA44 CA46

4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA02

BA22 CAL7 NAL4 ZA96 ZA97

2821

40086 AAO) BA16 MAOI MAU4 NAI4

ZA96 ZA97 ZB21

48045 AA10 AA30 BA10 CA40 BA20

EASO PA74